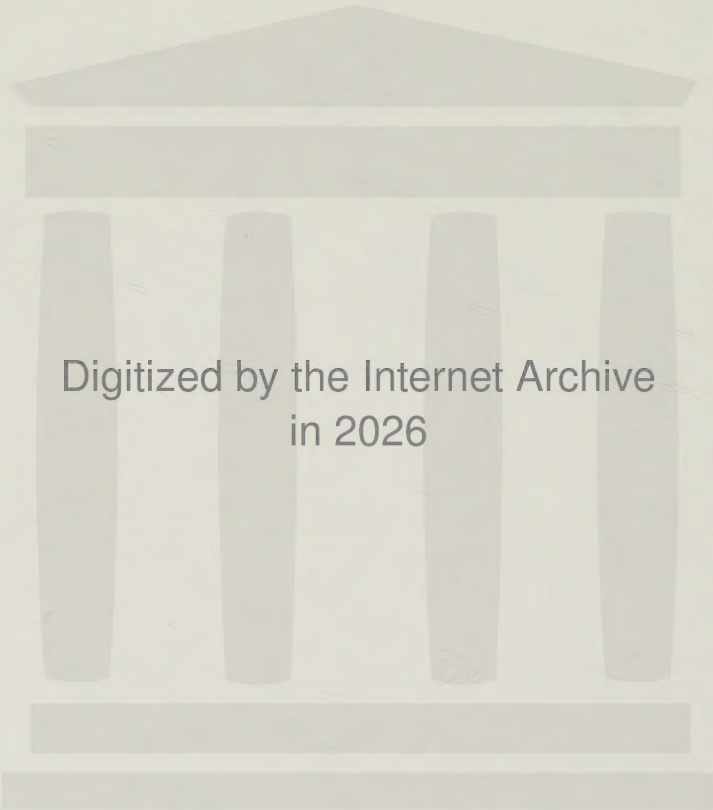


DIE MEMBRAN
ALS REAKTIONSRaum
FÜR ENZYMATISCHE PROZESSE

ENZYMKINETISCHE STUDIEN
AN DER MEMBRANGEBUNDENEN
SIALIDASE DES NERVENSYSTEMS

Günther Scheel

Diss.
München
1984



Digitized by the Internet Archive
in 2026

DIE MEMBRAN ALS REAKTIONSRaum FÜR ENZYMATISCHE
PROZESSE
ENZYMKINETISCHE STUDIEN AN DER MEMBRANGEBUNDENEN SIALIDASE
DES NERVENSYSTEMS

Dissertation
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Günther Scheel
aus
Bad Reichenhall

München 1984

1. Berichterstatter: Prof. Dr. K. Sandhoff

2. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Hartmann

Tag der Einreichung: 13. Januar 1984

Tag der mündlichen Prüfung: 26. April 1984

Herrn Prof. Dr. Sandhoff bin ich für die Anregung zu dieser Arbeit, sowie für eine stetige Förderung und zahlreiche kritische Diskussionen zu großem Dank verpflichtet.

Den Herren Dr. G. Schwarzmann und P. Hoffmann-Bleihauer danke ich für viele anregende Gespräche und für ihre sachkundige Unterstützung bei der Durchführung synthetischer Arbeiten.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau H. Nehr Korn und D. Schmitz für die gewissenhafte und umsichtige Durchführung vieler enzymatischer Messungen.

Den Herren Dr. R. Pellkofer und E. Acevedo danke ich für die stets gute Zusammenarbeit und Herrn Dr. D. Marsh (Max-Planck-Institut für Biophysik, Göttingen) für die Hilfe bei der Durchführung der ESR-Messungen.

Für den großen Einsatz bei der Anfertigung der vielen Zeichnungen und Fotos bin ich Frau K. Lempke und Herrn O. Küpper zu großem Dank verpflichtet. Nicht zuletzt danke ich Frau G. Winter für die geschickte Anfertigung der Maschinenschrift.

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. Einleitung	1
2. Eigenschaften der membrangebundenen Sialidase des Kalbshirns	10
2.1. Kurze Charakterisierung der verwendeten, sialidasehaltigen Membranpräparationen	10
2.1.1. Vergleich mikrosomaler und synaptischer Membranen	10
2.1.2. Enzymatischer Test der membrangebundenen Sialidase mit verschiedenen Substraten	12
2.1.2.1. Sialidasetest mit 4-MU-NeuAc als Substrat	13
2.1.2.2. Sialidasetest mit [^3H]-Sialyllactit als Substrat	13
2.1.2.3. Sialidasetest mit [^3H]-Gangliosid als Substrat	13
2.1.3. Grundlegende Versuche zu den Testbedingungen	14
2.2. Untersuchungen zur Stabilität der Sialidase	16
2.2.1. Stabilität der Sialidase gegen Einfrieren und tiefgefrorene Lagerung	16
2.2.2. Stabilität der Sialidase bei verschiedenen Temperaturen	20
2.2.3. Stabilität der Sialidase bei verschiedenen pH-Werten und Ionenstärken	28
2.2.4. Stabilität der Sialidase gegen Proteasen	32
2.2.5. Stabilität der Sialidase gegen Detergentien	34
2.3. Einfluß der Lokalisation von Enzym und Substrat auf die sialidasekatalysierte Gangliosidspaltung	39
2.3.1. Abbau endogener Gangliosidsubstrate	41
2.3.2. Abbau exogenen Gangliosids G_{D1a} in Gegenwart von Detergens	45
2.3.3. Abbau exogenen Gangliosids G_{D1a}	46
2.3.4. Abbau exogenen, lipidmembrangebundenen Gangliosids G_{D1a}	48
2.3.5. Untersuchungen zur eigentlich abbaubaren Form exogenen Gangliosids G_{D1a}	50
2.3.5.1. Rückschlüsse aus der Lokalisation des Abbauprodukts Gangliosid G_{M1}	51
2.3.5.2. Rückschlüsse aus der Wechselwirkung eines spinmarkierten Gangliosidanalogons mit mikrosomalen Membranen	53

	Seite
2.4. Einfluß des Ionenmilieus auf die enzymatische Aktivität der membrangebundenen Sialidase	61
2.4.1. Einfluß des pH-Werts	61
2.4.2. Einfluß der Pufferanionen	68
2.4.3. Einfluß der Salzkonzentration	69
2.5. Untersuchungen zum Vorkommen mehrerer Sialidasen in der verwendeten Enzympräparation	79
2.5.1. Hemmstudien mit 2-Deoxy-2,3-dehydro-NeuAc (NeuAc-2-en)	80
2.5.2. Gleichzeitiger Abbau von 4-MU-NeuAc und Gangliosid G _{D1a} durch die membrangebundene Sialidase	84
2.5.3. Partielle Reinigung der membrangebundenen Sialidase	89
3. Erstellung eines kinetischen Modells für die Wechselwirkung der membrangebundenen Sialidase mit ihren Substraten	93
3.1. Der Gangliosideinbau in die enzymhaltigen Membranen	93
3.2. Die Membran als Reaktionsraum	94
3.3. Die Verknüpfung zwischen Enzymmenge und Reaktionsvolumen	95
3.4. Die Verknüpfung zwischen Membranviskosität und Reaktionsgeschwindigkeit	98
4. Experimentelle Überprüfung des vorgeschlagenen Modells	100
4.1. Beeinflussung des Umsatzes von Gangliosid G _{D1a} durch die Geschwindigkeit seines Einbaus in die sialidasehaltigen Membranen	100
4.2. Unabhängigkeit des Gangliosidumsatzes durch die membrangebundene Sialidase vom Ansatzvolumen	106
4.3. Abhängigkeit der spezifischen Geschwindigkeit und der Michaelis-Konstanten für den sialidasekatalysierten Substratumsatz von der eingesetzten Enzymmenge	111
4.4. Einfluß der Membranfluidität auf den Substratumsatz durch die membrangebundene Sialidase	115
4.4.1. Bestimmung der Fluidität mikrosomaler Membranen	116
4.4.2. Substratumsatz durch die membrangebundene Sialidase bei erhöhter Membranfluidität	121
4.4.3. Korrelation zwischen Gangliosidumsatz und Membranfluidität	135
4.4.4. Abhängigkeit der Michaelis-Konstanten für den sialidasekatalysierten Substratumsatz von der Membranfluidität	137
4.5. Einige Versuchsergebnisse, die über das Modell hinausweisen	141

	Seite
5. Zusammenfassung und Diskussion	149
5.1. Charakterisierung der membrangebundenen Sialidase	150
5.2. Modellvorstellungen zum Abbau hydrophiler und amphiphiler Substrate durch die membrangebundene Sialidase	153
5.3. Einige kritische Bemerkungen zu den Versuchsbedingungen und weitere Kontrollversuche	159
5.4. Grenzen des entworfenen Modells und einige darüber hinausgehende Spekulationen	163
5.5. Ausblick auf die physiologische Bedeutung der vorgestellten Ergebnisse	165
6. Materialien und Methoden	171
6.1. Materialien	171
6.1.1. Geräte	171
6.1.2. Chemikalien	171
6.1.3. Reinigung von [^3H]-Sialyllactit	172
6.1.4. Darstellung von [^3H]-Gangliosid G_{D1a}	172
6.1.5. Synthese eines tritium- und spinmarkierten Gangliosid- G_{D1a} -Analogons ([^3H]-Doxyl-" G_{D1a} ")	173
6.2. Präparation der membrangebundenen Sialidase	174
6.2.1. Anreicherung synaptischer Plasmamembranen	174
6.2.2. Anreicherung mikrosomaler Membranen	174
6.2.3. Leitenzyme	175
6.2.4. Proteinbestimmung	175
6.3. Bestimmung der Sialidaseaktivität	175
6.3.1. 4-MU-NeuAc als Substrat	175
6.3.2. [^3H]-Sialyllactit als Substrat	176
6.3.3. [^3H]-Gangliosid G_{D1a} als Substrat	177
6.3.4. [^3H]-Gangliosid- G_{D1a} -haltige Lipidvesikel als Substrat	178
6.3.5. Endogene Ganglioside als Substrat	180
6.3.6. Ermittlung der enzymkinetischen Parameter K_M und V_{max}	181
6.3.6.1. Michaelis-Menten-Gleichung und ihre über die Zeit integrierte Form	181
6.3.6.2. Angewendete Rechenverfahren	183
6.3.6.3. Einfluß endogener Substrate	184

	Seite
6.4. Untersuchungen zum Einbau mizellaren Gangliosids in mikrosomale Membranen	186
6.4.1. Bestimmung der [^3H]-Gangliosid-Zusammensetzung von Gangliosidmizellen und mikrosomalen Membranen nach erfolgter Sialidaseeinwirkung	186
6.4.2. Einbau des tritium- und spinmarkierten Gangliosid- G_{D1a} -Analogons [^3H]-Doxyl-" G_{D1a} " in mikrosomale Membranen	186
6.5. Partielle Reinigung der membrangebundenen Sialidase	187
6.5.1. Extraktion der Sialidase aus mikrosomalen Membranen	187
6.5.2. Differentielle Zentrifugation im Saccharosegradienten	187
6.5.3. Isoelektrische Fokussierung	188
6.6. Bestimmung der Fluidität mikrosomaler Membranen durch Messung der Fluoreszenzdepolarisation	189
6.6.1. Theorie und Auswertung der Fluoreszenzdepolarisationsmessung	189
6.6.2. Experimentelle Durchführung der Fluoreszenzdepolarisationsmessung	194
6.6.3. Ergebnisse einiger Kontrollmessungen	195
7. Literaturverzeichnis	196
8. Zusammenfassung	207
Lebenslauf	

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Glc = D-Glucose

Gal = D-Galaktose

GalNAc = N-Acetyl-D-galaktosamin

NeuAc = N-Acetylneuraminsäure

NeuAc-2-en = 2-Deoxy-2,3-dehydro-N-acetylneuraminsäure

Sialyllactose = NeuAc (α 2-3)Gal(β 1-4)Glc

[^3H]-Sialyllactit = NeuAc (α 2-3)Gal(β 1-4)[^3H]-Sorbit

[^3H]-Lactit = Gal(β 1-4)[^3H]-Sorbit

4-MU-NeuAc = 4-Methylumbelliferyl- α -N-acetylneuraminsäure

Gangliosid G_{M1} = $\text{II}^3\text{NeuAc-GgOse}_4\text{Cer}$ = $\text{Gal}(\beta 1-3)\text{GalNAc}(\beta 1-4)[\text{NeuAc}(\alpha 2-3)]$
 $\text{Gal}(\beta 1-4)\text{Glc}(\beta 1-1)\text{Cer}$

[^3H]-Gangliosid G_{M1} = $\text{II}^3\text{NeuAc-GgOse}_4$ [^3H]-Cer

Gangliosid G_{D1a} = IV^3NeuAc , $\text{II}^3\text{NeuAc-GgOse}_4\text{Cer}$ = $\text{NeuAc}(\alpha 2-3)\text{Gal}(\beta 1-3)$
 $\text{GalNAc}(\beta 1-4)[\text{NeuAc}(\alpha 2-3)]\text{Gal}(\beta 1-4)\text{Glc}(\beta 1-1)\text{Cer}$

[^3H]-Gangliosid G_{D1a} = IV^3NeuAc , $\text{II}^3\text{NeuAc-GgOse}_4$ [^3H]-Cer

Disialogangliotetraose = IV^3NeuAc , $\text{II}^3\text{NeuAc-GgOse}_4$

9-Doxylstearinsäure = 9-(N-Oxy-4,4'-dimethyloxazolidinyl)-stearinsäure

[^3H]-Doxyl-" G_{D1a} " = 1-Deoxy-1-[2'-(9'-doxylstearoylamino)-stearoylamino]-
 $[^3\text{H}]$ -disialogangliotetraose (zur Strukturformel s.

Abb. 14, S. 54)

Tris = 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol

DPH = 1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatrien

ESR = Elektronenspinresonanz

$M = \frac{\text{mol}}{l}$

Ü = Übersichtsartikel

1. Einleitung

Membranen gehören zu den grundlegenden Strukturmerkmalen aller lebenden Systeme, von den einfachsten bis zu den höchstorganisierten. Trotzdem wurde ihnen lange Zeit von seiten der Biochemie vergleichsweise wenig Aufmerksamkeit geschenkt. Erst in den beiden letzten Jahrzehnten hat man intensiv ihren Aufbau erforscht und die Vielfalt und Wichtigkeit ihrer Aufgaben erkannt. Sie grenzen nicht nur einzelne Zellen voneinander ab und unterteilen jede Zelle wiederum in Reaktionsräume unterschiedlicher Zusammensetzung und Funktion (Kompartimentierung), sondern sie sind auch selbst Schauplatz einer Vielzahl verschiedenster biochemischer Vorgänge und Reaktionen (z.B. Ü 33, Ü 58, Ü 190, 59). Ihr Aufbau aus Lipiden und Proteinen führte anhand der bis dahin bekannten physikochemischen Daten vor gut zehn Jahren zum heute allgemein akzeptierten Membranmodell des "flüssigen Mosaiks" (241), das seither mehrfach ergänzt und erweitert wurde (242, 170, 93, Ü 102, 100, Ü 190). Abb. 1 zeigt eine einfache Darstellung eines dieser Modelle.

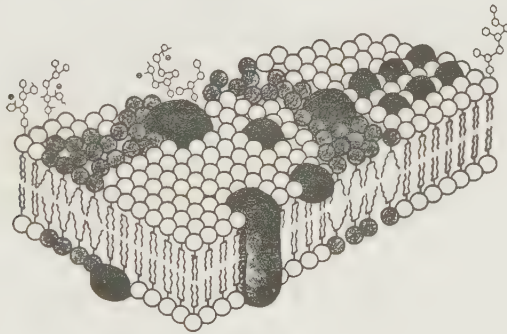


Abb. 1

Schematischer Aufbau einer biologischen Membran (verändert nach 102, 108).

In eine Doppelschicht aus Lipiden sind Proteine eingelagert. Prinzipiell sind diese Membranbestandteile innerhalb der Membranebene gegeneinander verschiebbar (laterale Beweglichkeit); abhängig von der Temperatur, sowie der Lipid- und Proteinzusammensetzung können sich jedoch Bereiche im Gelzustand ausbilden (angedeutet durch die parallelen Fettsäureketten), in denen die laterale Beweglichkeit stark eingeschränkt ist. An der linken Seite sind Kohlenhydratseitenketten von Glykolipiden und Glykoproteinen angedeutet, die über die Membranoberfläche herausragen.

Heute liegt der Schwerpunkt der Forschung nicht mehr so sehr auf den bloß "statischen" Eigenschaften von Membranen, sondern auf ihren dynamischen Aspekten wie lateralem und transversalem Transport, Membranneubildung und -abbau, Membranasymmetrie und -fusion, sowie dem Membranfluß innerhalb der verschiedenen Zellmembranen (z.B. Ü 190). In den Augen des Chemikers erscheint besonders interessant, wie überhaupt enzymatisch katalysierte Reaktionen ablaufen, an denen membrangebundene Reaktionspartner beteiligt sind. Als solche Reaktionspartner kommen in erster Linie die Lipide selbst in Betracht, die als Strukturbildner der Membranen einen Großteil ihrer Substanz ausmachen und einem ausgedehnten Stoffwechsel unterliegen. Neben diesen strukturbildenden Lipiden wie Phospholipiden und Sphingomyelin, die mehr oder weniger in allen Wirbeltierzellmembranen vorkommen, hat man in den letzten Jahren eine mengenmäßig zwar kleinere, strukturell aber sehr vielfältige Gruppe von Lipiden, die Glykosphingolipide, eingehend untersucht. Sie finden sich vornehmlich auf der Außenseite von Plasmamembranen (69, 290, 67, 287, vgl. auch 55), aber auch in anderen subzellulären Membranen, und man schreibt ihnen weniger strukturbildende Eigenschaften als vielmehr wichtige biologische Funktionen im Membranverband zu (z.B. Ü 56, 148, 67, 198). So vermutet man, daß die neuraminsäurehaltigen Glykolipide, die Ganglioside, welche in ungewöhnlich hoher Konzentration in der Hirnsubstanz vorkommen (z.B. 251), in engem Zusammenhang mit den Funktionen des Zentralnervensystems stehen. Man hat festgestellt, daß sich Gangliosidgehalt und -zusammensetzung im Gehirn im Verlauf der frühkindlichen Hirnentwicklung des Säugers spezifisch und z.T. sogar drastisch ändern (297, 298). Auch manche Vorgänge im Gehirn, wie das Erlernen bestimmter Verhaltensweisen (92, 51, 212) oder chemisch induzierte epileptische Anfälle (296) gehen mit Veränderungen im Gangliosidstoffwechsel einher.

Neben solchen mehr allgemeinen Hinweisen auf die Bedeutung der Ganglioside für das Nervensystem kennt man eine Reihe weiterer, speziellerer Befunde zu möglichen Gangliosidfunktionen (z.T. zusammengefaßt in Ü 56, 162, 89): Ganglioside sind negativ geladen und vermögen neben anderen Ionen vor allem Ca^{2+} zu binden (10, 189, 147). Infolge ihrer hohen Konzentration in manchen neuronalen Membranen (s.u.) dürften sie einen erheblichen Beitrag zu deren Oberflächenladung leisten (218, 254, vgl. 17). Sie dienen als Bindungsstellen für Hormone (165, 127), Serotonin (288, 269), Interferon (12, 274, 117, 275) und Toxine wie Choleratoxin (88, 211, 72, 105) und Tetanustoxin (82, 268, 46). Aufgrund dieser und anderer Ergebnisse vermuten manche Autoren,

daß Ganglioside an der Erregungsleitung (285) und der synaptischen Übertragung (251, 146, Ü 194, 193) beteiligt sind. Gestützt werden solche Überlegungen durch den hohen Gangliosidgehalt der grauen Hirnsubstanz - etwa 15 bis 30 mal so groß wie z.B. der von der Leber (251, Ü 123) - und durch die subzelluläre Verteilung der Ganglioside im Hirngewebe. Besonders reich an Gangliosiden sind nämlich Nervenendigungsmembranen, genauer synaptische Plasmamembranen, wo sie fünf bis zehn Prozent des Lipidgehaltes ausmachen können (z.B. 72, 187, 17, Ü 123). Sehr wahrscheinlich gilt ein ähnlich hoher Gehalt sogar für die gesamte neuronale Plasmamembran, also einschließlich derjenigen des Perikaryons und der Dendriten (Ü 123, 124, 243). Dies könnte erklären, warum mehrere Autoren für mikrosomale Membranen ähnliche oder sogar höhere Gangliosidgehalte als für synaptische Membranen fanden (z.B. 298, 296, 243), da mikrosomale Hirnfraktionen neben Membranen des endoplasmatischen Retikulums auch beträchtliche Anteile an Plasmamembranen enthalten (Ü 123, 121, 239, 231, 243).

Strukturell ist allen Gangliosiden - wie bereits angedeutet - gemeinsam, daß sie neben den allen Glykosphingolipiden eigenen Bestandteilen Sphingosin, Fettsäure und Zuckerrest noch Neuraminsäure enthalten. Diese kann α -ketosidisch entweder in 3-Stellung (seltener auch in 6-Stellung) an Galaktosereste des Zuckeranteils oder in 8-Stellung an bereits vorhandene Neuraminsäurereste geknüpft sein (z.B. Ü 123). Einige typische Vertreter der Ganglioside aus der Ganglio-Reihe zeigt Abb. 2. (zur Nomenklatur vgl. 248, 250, sowie Ü 123 und 96). Neben der dort gezeigten N-Acetylneuraminsäure kommen in Gangliosiden auch N-Glykolyl- und O-Acetyl-substituierte Neuraminsäuren vor (z.B. 78, 213, Ü 35, 244), die in ihrer Gesamtheit als Sialinsäuren bezeichnet werden.

In wässrigen Systemen sind die Ganglioside, insbesondere die "höheren" mit mehr als drei Zuckerresten, gut löslich, ohne daß sie wie die meisten anderen Lipide mit Ultraschall behandelt werden müßten. Ganglioside gehören zwar ebenso wie die anderen Phospho- und Sphingolipide zu den amphiphilen Substanzen, infolge ihres Zuckeranteils und der mit den Neuraminsäuren eingeführten negativen Ladungen (der pK_s -Wert der freien Neuraminsäure liegt bei 2.6 - 2.75, vgl. 122) wird ihr hydrophiler Molekülteil jedoch so umfangreich, daß sie in reiner Form keine Lipiddoppelschichten, sondern spontan klare, mizellare Lösungen bilden. Wie für andere mizellbildende Verbindungen hat man auch für Ganglioside versucht, ihre "kritische Mizellkon-

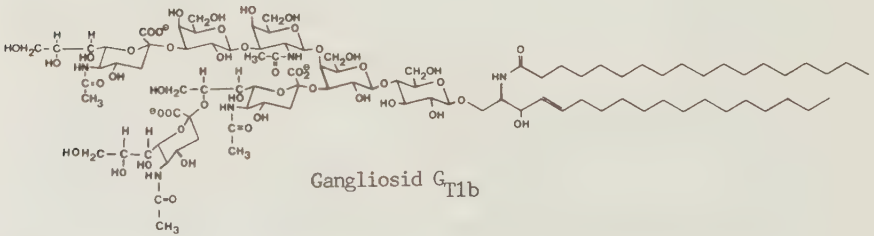
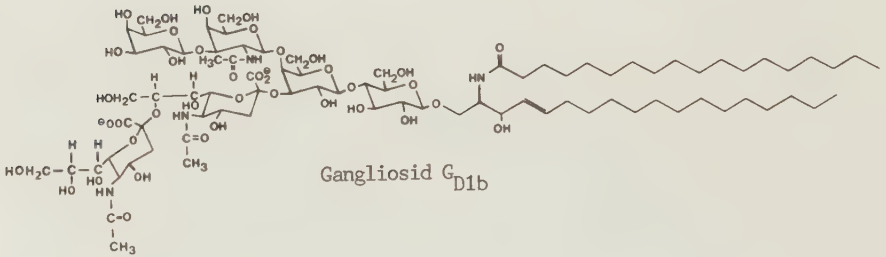
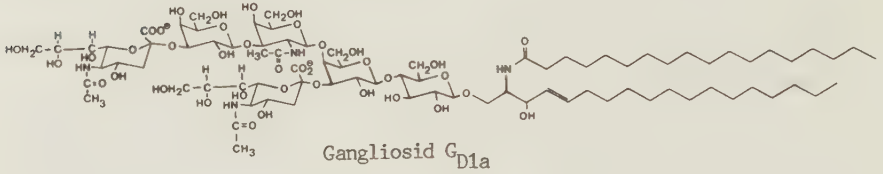
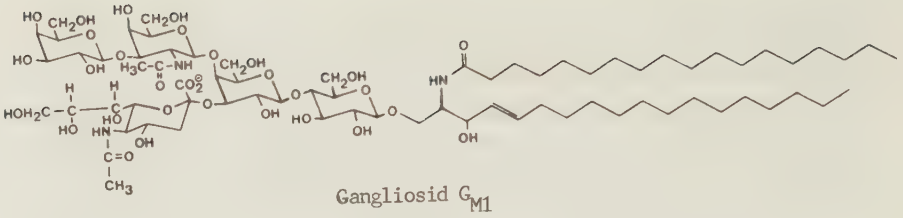


Abb. 2

Struktur einiger häufig vorkommender Ganglioside aus der Ganglio-Reihe

zentration", d.h. die höchste Konzentration, bei der sie gerade noch monomer löslich sind, zu bestimmen. Frühere Arbeiten erhielten dabei Werte zwischen 10^{-5} und 10^{-4} M (62, 195, 91, 292), aufgrund neuerer Untersuchungen mit verbesserten Meßmethoden muß man jedoch davon ausgehen, daß die kritische Mizellkonzentration der Ganglioside unter 10^{-6} M (36,7), vermutlich bei 10^{-10} bis 10^{-8} M (163, 57) liegt. Untersuchungen der Laserlichtstreuung und des Sedimentationsverhaltens in der Ultrazentrifuge ergaben für Gangliosidmizellen eine scheibenförmige Gestalt mit einem Achsenverhältnis von etwa 2:1 und einen Monomergehalt pro Mizelle von 120 bis 350, je nach Art des Gangliosids und der Meßmethode (62, 36, 293).

Im Gemisch mit Phospholipiden formen die Ganglioside bei kleinem Phospholipid/Gangliosid-Verhältnis ebenfalls noch mizellare Mischaggregate, die erst oberhalb von 60 bis 80 mol-% Phospholipid in lamellare Strukturen übergehen (84, 240, 7, 272). In Mengen unterhalb 20 mol-% haben die Ganglioside eine leicht verfestigende Wirkung auf Phospholipidmembranen (240, 7, 263, 147, 55, 11) und neigen - vor allem in Gegenwart von Ca^{2+} - zu lateraler Phasentrennung, d.h. zu Entmischung und Bildung eigener Aggregate (sog. Domänen oder engl. "cluster") innerhalb der Membran (44, 11, 233, 128, 232). Solche Phasentrennungen treten ganz allgemein auch in biologischen Membranen auf (z.B. Ü 102, Ü 28, 112, 140, 224), die ja aus einem Gemisch vieler verschiedener Lipide und Proteine bestehen.

Ihren Platz in der Membran erhalten die Ganglioside vermutlich bereits während ihrer Biosynthese aus membranständigem Ceramid (N-Acyl-Sphingosin) und verschiedenen aktivierten Zuckern (UDP-Zucker bzw. CMP-Sialsäure). Das schrittweise Anknüpfen der Zuckerreste an das entstehende Gangliosid wird von verschiedenen spezifischen Zuckertransferasen katalysiert, die in Golgimembranfraktionen und neuerdings auch in Plasmamembranfraktionen gefunden wurden (120, Ü 56, 173, 41, 8). Insbesondere wurden hohe spezifische Aktivitäten an Sialyltransferasen in synaptischen Plasmamembranen und mikrosomalen Membranen aus Gehirn nachgewiesen (Ü 56, 45, 187), so daß die letzten Schritte der Gangliosidbiosynthese, das Anknüpfen endständiger Sialsäuren, auch in neuronalen Plasmamembranen ablaufen dürften.

Der biologische Abbau der Ganglioside wird - in umgekehrter Reihenfolge der Biosynthese - eingeleitet durch die Abspaltung endständiger Sialsäurereste, worauf dann Schritt für Schritt die anderen Zucker folgen (63, 42).

Dieser erste Schritt wird vom Enzym N-Acetylneuraminylglykohydrolase (EC 3.2.1.18), kurz Sialidase oder Neuraminidase genannt, katalysiert. Dieses Enzym kommt nicht nur in Wirbeltieren vor, die auch die Gangliosidsubstrate synthetisieren können, sondern auch in Viren und Bakterien. Die viralen und bakteriellen Sialidasen sind oft wasserlösliche, biochemisch relativ gut charakterisierte Enzyme und werden häufig für biochemische Studien eingesetzt (192, 37, 24, 199, Ü 35).

Die Sialidasen der Wirbeltiere hingegen sind viel schwieriger zu untersuchen, und z.T. sind die Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen kontrovers. Lediglich zu den Sialidasen einiger Säugetiere liegen einigermaßen gesicherte Erkenntnisse vor. Im Säugerorganismus findet man das Enzym besonders reichlich in Leber und Hirn (22), aber auch in anderen Organen (199). Es ist meist fest an Membranen gebunden oder mit diesen assoziiert (156, 171, 255, 111), jedoch sind je nach Spezies und Organ mehrere Formen bekannt geworden (Ü 35):

a) lösliche, cytosolische Form

gefunden z.B. in Rattenleber (262, 23), Rattenhirn (23, 254, 273), Schweinehirn (254, 271)

b) lysosomale Form

gefunden z.B. in Rattenleber (90, 262, 111), Menschenleber (154, 156)

c) (plasma-)membrangebundene Form

gefunden z.B. in Rattenleber (217, 277, 111), Rattenhirn (252, 294), Kaninchenhirn (255), Rinder- bzw. Kalbshirn (216, 218, 295)

Von diesen verschiedenen Formen bietet sich nun die membrangebundene Säugerhirnsialidase besonders für Studien enzymatischer Reaktionen in Membranen an, da sie gerade in den Hirnregionen und Nervenzellmembranen die höchste spezifische Aktivität erreicht, in denen auch ihre natürlichen Substrate, die Ganglioside, die höchste Konzentration aufweisen (201, 66, 252, 294). Besonders schön ließ sich das an Kaninchen- und Kalbshirn zeigen, die nahezu ausschließlich die membrangebundene Enzymform enthalten (129, 66, 254): Bei Untersuchungen der subzellulären Verteilung erreichte die Sialidase in synaptischen Plasmamembranen und mikrosomalen Membranen sowohl die höchste Gesamtaktivität als auch die höchste spezifische Aktivität (255, 216, 187, 259). Daß die Ganglioside in diesen Membranen ebenfalls angereichert sind, wurde bereits erwähnt und zum Teil in denselben Arbeiten gezeigt (255, 187, 259). Dieses erstaunlich parallele Vorkommen

von Substrat und abbauendem Enzym in den gleichen Membranen wirft die Frage auf, wie die Ganglioside in Gegenwart der Sialidase so stabil zu sein vermögen, daß sie in den genannten Membranen bis zu 10 % des Gesamtlipids ausmachen können. Wie werden die Ganglioside vor dem enzymatischen Angriff geschützt bzw. welche Faktoren beeinflussen die Sialidase in ihrer Aktivität ?

Sehr intensiv wurde in dieser Hinsicht die membrangebundene Sialidase des Kalbshirns untersucht. Dieses Enzym vermag tatsächlich in seiner natürlichen Membranumgebung auch aus den in der Membran enthaltenen (endogenen) Substraten Sialsäure freizusetzen (z.B. 216, 223). Ganglioside werden dabei bevorzugt umgesetzt, jedoch dienen auch sialsäurehaltige Glykoproteine als Substrate (79, 185, 257). Setzt man den Enzympräparationen von außen Substrate zu, so werden diese ebenfalls gespalten (z.B. 79, 218, 207), z.T. jedoch erst nach erfolgtem Abbau endogener Substrate (216). Wiederum werden zugesetzte Ganglioside deutlich schneller und mit höherer Affinität umgesetzt als Sialoglykoproteine und Sialooligosaccharide (186, 209), wobei aber die quantitativen Angaben in der Literatur teilweise weit auseinandergehen. So variieren die Michaelis-Konstanten für das wasserlösliche Trisaccharid Sialyllactose zwischen 0.68 und 2 mM, für Ganglioside zwischen 0.02 und 0.38 mM (216, 186, 79). Eine Ursache dieser Unterschiede liegt sehr wahrscheinlich in der Verschiedenheit der verwendeten Membranpräparationen, die z.T. mit Detergentien vorbehandelt worden waren.

Eine exakte Charakterisierung der Sialidase des Kalbshirns nach herkömmlichen Methoden der Enzymkinetik scheitert an ihrer festen Integration im Membranverband. Eine Isolierung und Reinigung gelang bisher trotz mehrfacher Versuche nur ansatzweise und unter dem Einsatz nichtionischer Detergentien (129, 175, 9). Die bisher wohl erfolgreichste Reinigung einer membrangebundenen Sialidase überhaupt wurde erst kürzlich für das lysosomale Enzym der menschlichen Leber berichtet (157). Mit Hilfe des nichtionischen Detergens Triton X-100 und Ultraschall konnte das Enzym in Lösung gebracht und durch Affinitätschromatographie über tausendfach angereichert werden. Solange nun für die Sialidase des Kalbshirns eine Reinigung und Reintegration in definierte Modellmembranen nicht möglich ist, muß man mit rohen Membranfraktionen auskommen, die ja immerhin den Vorteil haben, daß sie der natürlichen Enzymumgebung noch einigermaßen entsprechen. Die von manchen Arbeitsgruppen (z.B. 186) vorgenommene Behandlung der Membranfraktionen mit Detergens erscheint in diesem Zusammenhang weniger sinnvoll, da man damit sicherlich die native Membranstruktur zerstört, ohne auf der anderen Seite eine

saubere, definierte Enzympräparation zu erhalten.

Im Zusammenhang mit der Verfügbarkeit endogener Substrate wurde festgestellt, daß durchaus nicht alle vorhandenen Sialsäurereste der enzymatischen Reaktion zugänglich sind. Aus endogenen Sialoglykoproteinen lassen sich lediglich 20 bis 40 % der insgesamt gebundenen Sialsäure freisetzen, aus Gangliosiden etwa 40 bis 50 % (79, 185). Aus den höheren Oligosialogangliosiden G_{D1a} , G_{D1b} , G_{T1} , etc. entsteht als gemeinsames Endprodukt das Monosialogangliosid G_{M1} , dessen an die innere Galaktose gebundene Sialsäure gegen den enzymatischen Angriff resistent ist (129, 216), vermutlich aus sterischen Gründen (Ü 35).

Das pH-Optimum der membrangebundenen Sialidase des Kalbshirns liegt je nach Substrat und sonstigen Bedingungen zwischen 3.1 und 4.4 (129, 186, 199, Ü 35), also recht niedrig für ein plasmamembrangebundenes Enzym. Ca^{2+} -Ionen in Konzentrationen über 1 mM hemmen den Gangliosidumsatz, während Na^{+} -Ionen bis 0.2 M keinen Einfluß haben (186, 218). Diese Hemmung durch physiologische Ca^{2+} -Konzentrationen läßt zusammen mit dem sauren pH-Optimum vermuten, daß das Enzym in seiner natürlichen Umgebung nahezu inaktiv sein könnte und erst durch lokale Absenkung von pH-Wert und Ionenkonzentration an der Membran aktiviert wird (218). Die angesprochene Koexistenz von Substrat und Enzym in der gleichen Membran wäre auf dieser Basis erklärlich, obwohl die Beweise für eine solche Hypothese bis jetzt fehlen und daneben andere Parameter, wie z.B. die Membranumgebung der Sialidase, nicht unberücksichtigt bleiben sollten. Es scheint ja ein allgemeines Kennzeichen von integral membrangebundenen Enzymen zu sein, daß ihre Aktivität auch von Lipid- und Fettsäurezusammensetzung, Membranfluidität, etc. abhängt und in der Regel in der nativen Membran maximale Werte annimmt (z.B. Ü 33, Ü 58, Ü 206, 59).

Interessanterweise bildet aber der Gangliosidumsatz durch die Sialidase aus Kalbshirn bezüglich letztgenannter Regel eine Ausnahme. Er sinkt nämlich nicht ab, wenn man den natürlichen Membranverband durch nicht zu hohe Konzentrationen des Detergens Triton X-100 stört, sondern läßt sich im Gegenteil dadurch stimulieren, z.T. sogar erheblich (79, 207). Erst Tritongehalte über 0.4 % führen dann zur erwarteten Aktivitätsabnahme. Sandhoff und Mitarbeiter (207, 209, 208, 175) konnten zeigen, daß auch andere Agentien ohne Detergenseigenschaften, wie die allgemeinen Anästhetika Lachgas, Diäthyläther, Halothan und Xenon, ähnliche Wirkung zeigten. Die Umsatzstei-

gerung konnten sie qualitativ mit einer durch diese Agentien verursachten Absenkung der Membranviskosität korrelieren. Daraus folgerten sie, daß das Gangliosid wahrscheinlich durch laterale Diffusion in der Membran zum Enzym gelangt, deren Geschwindigkeit wiederum von der Membranviskosität abhängen dürfte (208, 175). In Übereinstimmung mit diesem Konzept wurde der Abbau des wasserlöslichen Substrats Sialyllactit durch die genannten Substanzen nicht beeinflußt oder sogar leicht inhibiert (209, 208).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es nun, diesen Modellentwurf zur Wechselwirkung eines membrangebundenen Enzyms mit einem ebenfalls membrangebundenen Substrat auszubauen, seine Voraussetzungen und Konsequenzen näher zu untersuchen und ihn anhand der Sialidase des Kalbshirns experimentell weiter zu untermauern. Dazu war zuerst einmal notwendig, ein möglichst genaues Bild über die Eigenschaften der verwendeten Enzympräparation zu gewinnen, da - wie bereits angedeutet - die Aussagen in der Literatur nicht immer einheitlich sind und teilweise unter recht unphysiologischen Bedingungen erhalten wurden. Zu diesem Zweck wurden u.a. Versuche zu pH-Ionen- und Temperatureinflüssen, zur Stabilität der Sialidase, zum Abbau endogener und exogener Substrate, zu Detergenseffekten und zur Auswirkung des Aggregationszustands des Gangliosidsubstrats auf seinen Umsatz durchgeführt. In Bezug auf den vergleichenden Abbau lipophiler und wasserlöslicher Substrate mußte außerdem untersucht werden, ob die Enzympräparation nicht mehrere Formen der Sialidase mit unterschiedlichen Substratspezifitäten enthalten könnte. Im Anschluß an die Resultate dieser Versuche wird dann das Modell über die Wechselwirkung der membrangebundenen Sialidase mit ihren Substraten dargelegt, gefolgt von der experimentellen Überprüfung der daraus abgeleiteten Konsequenzen und einigen Versuchen zu noch offen gebliebenen Fragen.

2. Eigenschaften der membrangebundenen Sialidase des Kalbshirns

2.1. Kurze Charakterisierung der verwendeten, sialidasehaltigen Membranpräparation

In der Einleitung wurde bereits ausgeführt, daß zwei subzelluläre Fraktionen aus Kalbshirn besonders reich an Sialidase sind, die synaptischen Plasmamembranen und die mikrosomalen Membranen. Damit erhob sich die Frage, welche dieser beiden Präparationen für die beabsichtigten Untersuchungen die geeignetere sei.

2.1.1. Vergleich mikrosomaler und synaptischer Membranen

Bei der subzellulären Fraktionierung von Hirngewebe gewinnt man die synaptischen Membranen in einem recht aufwendigen Verfahren aus dem rohen mitochondrialen Sediment, das neben Mitochondrien auch intakte Lysosomen und Synaptosomen enthält, die mikrosomalen Membranen dagegen aus dem zugehörigen Überstand, da sie kleinere Bruchstücke verschiedener zellulärer Membranen darstellen. Beide Membranpräparationen waren in unserem Arbeitskreis gebräuchlich (223, 214, 181, 1) und sind in Tab. 1 bezüglich ihres Gehalts an verschiedenen Leitenzymen miteinander verglichen. Die beiden lysosomalen Leitenzyme, saure Phosphatase und Hexosaminidase, zeigen etwas widersprüchliche Aktivitätswerte, doch scheinen insgesamt beide Präparationen in ähnlichem Ausmaß mit lysosomalen Membranen verunreinigt zu sein. Die synaptischen Membranen enthalten sehr viel mehr mitochondriale Membranen (Cytochrom-c - Oxidase), während die Acetylcholinesterase als Bestandteil von Plasmamembranen in den Mikrosomen stärker angereichert ist. Der Gehalt beider Fraktionen an Sialidaseaktivität, gemessen mit dem wasserlöslichen Substrat 4-MU-NeuAc unter Standardbedingungen (s.u.), betrug für Mikrosomen 12 und für synaptische Membranen 11 $\frac{\text{nmol}}{\text{h} \cdot \text{mg}}$, so daß von daher beide Membranpräparationen gleichwertig waren.

Bei Betrachtung der Leitenzymdaten fällt auf, daß abgesehen von der Cytochromoxidase keines der anderen Enzyme eine ausgeprägte Anreicherung oder Verminderung gegenüber dem Homogenat erfuhr. Soweit zu Kalbshirn und den verwendeten Leitenzymen Vergleichsdaten in der Literatur zu finden waren, sind diese jedoch recht ähnlich. So erzielten Schengrund und Rosenberg (216)

Tab. 1

Gehalt synaptischer und mikrosomaler Membranen an einigen Leitenzymen, verglichen mit dem Ausgangshomogenat

Angegeben sind die spezifischen Aktivitäten in $\frac{\mu\text{mol}}{\text{h} \cdot \text{mg}}$.

Die Durchführung erfolgte in Zusammenarbeit mit E. Acevedo (s. 1, sowie Abschnitt 6.2.3.)

	Homogenat	Synaptische Membranen	Mikrosomale Membranen
Saure Phosphatase	0.41	0.40	0.59
Hexosaminidase	0.26	0.30	0.15
Cytochrom-c-Oxidase	44	28	1.7
Acetylcholinesterase	1.0	1.4	1.9

auch nur eine deutliche Verringerung des Mitochondriengehalts, während die beiden lysosomalen Leitenzyme nur schwach bis mäßig erniedrigt waren (Faktoren zwischen 0.89 und 0.34). Die mikrosomale Fraktion von Preti et.al. (187) enthielt - verglichen mit dem Homogenat - die etwa 1.9-fache spezifische Aktivität an Acetylcholinesterase, die synaptischen Plasmamembranen etwa die 3.6-fache. Während der Wert für die Mikrosomen sehr gut mit den eigenen Daten in Tab. 1 übereinstimmt, liegt derjenige für die synaptischen Membranen deutlich höher. Hierbei muß man aber berücksichtigen, daß Preti et. al. ein noch aufwendigeres Verfahren für die subzelluläre Fraktionierung benutzten und nach ihren eigenen Angaben eine Ausbeute von nur 1 % (!) der im Homogenat enthaltenen synaptischen Membranen in Kauf nahmen.

Die ermittelten Leitenzymdaten für mikrosomale und synaptische Membranen stimmen also recht gut mit den Angaben in der Literatur überein und zeigen, daß beide Präparationen gleich gut als Sialidasequelle brauchbar sind. Mikrosomale Membranen lassen sich jedoch in viel höherer Ausbeute und obendrein viel einfacher, schneller und damit schonender für die native Membranstruktur gewinnen, so daß für alle weiteren Untersuchungen zu den Wechselwirkungen der membrangebundenen Sialidase mit ihren Substraten mikrosomale Membranen als Enzympräparation benutzt wurden. Im Lauf der Versuche stellte sich heraus, daß mikrosomale Fraktionen aus verschiedenen Aufarbeitungsgängen nie die ganz gleichen Aktivitäts-

ten an Sialidase enthielten. Um trotzdem soweit wie möglich verschiedene Versuchsreihen miteinander vergleichen zu können, wurden die verwendeten Mikrosomenpräparationen mit Großbuchstaben bezeichnet (M.A bis M.H), die in den Legenden zu Abbildungen und Tabellen angegeben sind.

Bevor nun die Untersuchungen zu den Eigenschaften der Sialidase vorgestellt werden, soll erst auf die Grundzüge der enzymatischen Tests mit den verschiedenen Sialidasesubstraten und auf die grundlegenden Inkubationsbedingungen kurz eingegangen werden.

2.1.2. Enzymatischer Test der membrangebundenen Sialidase mit verschiedenen Substraten

Bis vor wenigen Jahren beruhten alle Meßmethoden für die Sialidaseaktivität auf der Quantifizierung der freigesetzten Sialsäure, die meist colorimetrisch nach Warren erfolgte (279). Trotz vieler Verbesserungsversuche (z.B. 70, 90, 216, 79, 291, 204) blieb dieses Verfahren zeitaufwendig, störanfällig und wenig empfindlich und hatte vor allem den Nachteil, daß es nicht nach Herkunft der Sialsäure aus verschiedenen Sialidasesubstraten unterscheiden konnte. So mußte man beim Studium des Abbaus endogener Substrate im Anschluß an die Reaktion Membranlipide und -proteine voneinander trennen, wollte man die Sialsäurefreisetzung aus Sialoglykolipiden (Gangliosiden) und Sialoglykoproteinen getrennt bestimmen (z.B. 79). Beim Einsatz exogener Substrate hingegen war man darauf angewiesen, die Sialidasepräparation durch Vorinkubation oder/und Detergensbehandlung von endogenen Substraten weitgehend zu befreien (z.B. 295, 253). Eine wesentliche Vereinfachung und Steigerung der Empfindlichkeit brachte dann vor einigen Jahren die Einführung radioaktiv markierter Substrate, wie des wasserlöslichen Oligosaccharids [^3H]-Sialyllactit durch Bhavanandan et. al. (13) und des lipophilen [^3H]-Gangliosids G_{D1a} durch unseren Arbeitskreis (223). Letzteres hatte zusätzlich den großen Vorteil, daß es zu den von der membrangebundenen Sialidase natürlicherweise bevorzugt gespaltenen Gangliosiden gehört (vgl. Einleitung). In jüngster Zeit wurde die Palette der künstlichen Sialidasesubstrate noch um das fluorogene Sialsäurederivat 4-MU-NeuAc erweitert, mit dem eine recht empfindliche und äußerst einfache Bestimmung der Sialidaseaktivität möglich ist (278, 183, 166). Da die Betonung der durchgeführten Arbeiten auf der Untersuchung des Umsatzes membrangebundener Substrate durch die ebenfalls membran-gebundene Sialidase lag, fanden von den genannten exogenen Substraten vor

allen das [^3H]-Gangliosid G_{D1a} Verwendung, zu Vergleichszwecken häufig aber auch wasserlösliche Substrate wie [^3H]-Sialyllactit und besonders 4-MU-NeuAc. Die Sialidasetests mit diesen drei Substraten sind im Folgenden kurz beschrieben (zur experimentellen Durchführung s. Kapitel 6.3.).

2.1.2.1. Sialidasetest mit 4-MU-NeuAc als Substrat

Bei der sialidasekatalysierten Spaltung wird aus dem nahezu fluoreszenz-freien 4-MU-NeuAc das stark fluoreszierende 4-Methylumbelliferon freigesetzt, dessen Fluoreszenz in alkalischer Lösung gemessen wird. Über die Eichung des Fluorimeters mit einer 4-Methylumbelliferonlösung bekannter Konzentration erhält man direkt die freigesetzte Menge an 4-Methylumbelliferon und damit an NeuAc.

2.1.2.2. Sialidasetest mit [^3H]-Sialyllactit als Substrat

[^3H]-Sialyllactit wird von der Sialidase in NeuAc und [^3H]-Lactit gespalten. An einer Anionenaustauschersäule werden [^3H]-Lactit und nicht umgesetztes [^3H]-Sialyllactit voneinander getrennt und die in beiden Fraktionen enthaltene Radioaktivität im Flüssigkeitsszintillationszähler quantifiziert. Der Quotient aus der Radioaktivität des Lactits und der Summe der Radioaktivitäten von Lactit und Sialyllactit gibt den relativen Abbau von Sialyllactit an, der sich anhand der eingesetzten Substratmenge in freigesetzte NeuAc umrechnen läßt.

2.1.2.3. Sialidasetest mit [^3H]-Gangliosid G_{D1a} als Substrat

Die Sialidase setzt das am Ceramidrest tritiummarkierte [^3H]-Gangliosid G_{D1a} zu [^3H]-Gangliosid G_{M1} und freier NeuAc um, so daß wie beim eben beschriebenen Test das Reaktionsprodukt von nicht umgesetztem Substrat abgetrennt werden muß. Im ursprünglichen Verfahren (223) geschah dies durch zwölfstündige Chromatographie an Kieselgel-60-Dünnschichtfolien, an die sich eine ebenfalls langwierige Lagebestimmung der radioaktiven Substanzflecken mit Hilfe des Radioscanners anschloß. Dann wurden die so identifizierten Flecke ausgeschnitten und die enthaltene Radioaktivität im Flüssigkeitsszintillationszähler ermittelt. Da mit dieser zeit- und materialaufwendigen

Methode die beabsichtigten Untersuchungen kaum alle hätten durchgeführt werden können, wurde in Anlehnung an Methoden zur Gangliosidreinigung (97) ein Verfahren entwickelt, um ähnlich wie beim Test mit [^3H]-Sialyllactit Substrat und Produkt durch Ionenaustauschchromatographie an kleinen Säulchen voneinander zu trennen (zu Durchführung und Kontrollexperimenten s. Abschnitt 6.3.3.). Die Radioaktivität in den Gangliosid G_{D1a} - bzw. G_{M1} -haltigen Eluaten konnte dann wieder im Flüssigkeitsszintillationszähler bestimmt und, wie im vorausgehenden Abschnitt beschrieben, in umgesetzte Substratmengen umgerechnet werden. Mit diesem neuen Verfahren wurde nicht nur die je Testansatz benötigte Zeit entscheidend verkürzt (pro Tag konnten bis zu 100 Ansätze bearbeitet werden), sondern die erzielten Ergebnisse waren obendrein genauer reproduzierbar.

Damit sind die Bestimmungsmethoden für die Aktivität der membrangebundenen Sialidase gegenüber verschiedenen Substraten abgehandelt, und der nächste Abschnitt wendet sich der Erarbeitung brauchbarer Bedingungen für die eigentliche enzymatische Reaktion zu.

2.1.3. Grundlegende Versuche zu den Testbedingungen

Die katalytische Aktivität eines Enzyms während der Inkubation mit seinem Substrat hängt ja von einer Vielzahl von Parametern, wie z.B. Temperatur, pH-Wert, Ionenmilieu, Substratkonzentration ab, und auch Enzymmenge und Inkubationszeit können nicht beliebig gewählt werden. Einige dieser Variablen werden in den folgenden Abschnitten noch eingehender untersucht, doch sollen an dieser Stelle die grundlegenden Inkubationsbedingungen kurz diskutiert werden. In Anlehnung an die natürliche Umgebung der Sialidase wurde als Inkubationstemperatur 37°C gewählt. Laut Literatur liegt der pH-Wert, unter dem das Enzym optimal arbeitet, in der Gegend von pH 4 (vgl. Einleitung), doch schwanken die Angaben je nach Substrat und Enzympräparation. Für die in dieser Arbeit verwendete Sialidase mikrosomaler Membranen aus Kalbshirn zeigt Abb. 3 die Abhängigkeit des Umsatzes der verschiedenen Substrate vom pH-Wert des Testansatzes. Der optimale pH variierte nur wenig mit dem Substrat zwischen pH 3.6 für Gangliosid G_{D1a} und pH 3.9 für Sialyllactit. Die Abbaurate für die beiden am häufigsten benutzten Substrate 4-MU-NeuAc und Gangliosid G_{D1a} stieg mit der eingesetzten Sialidasemenge

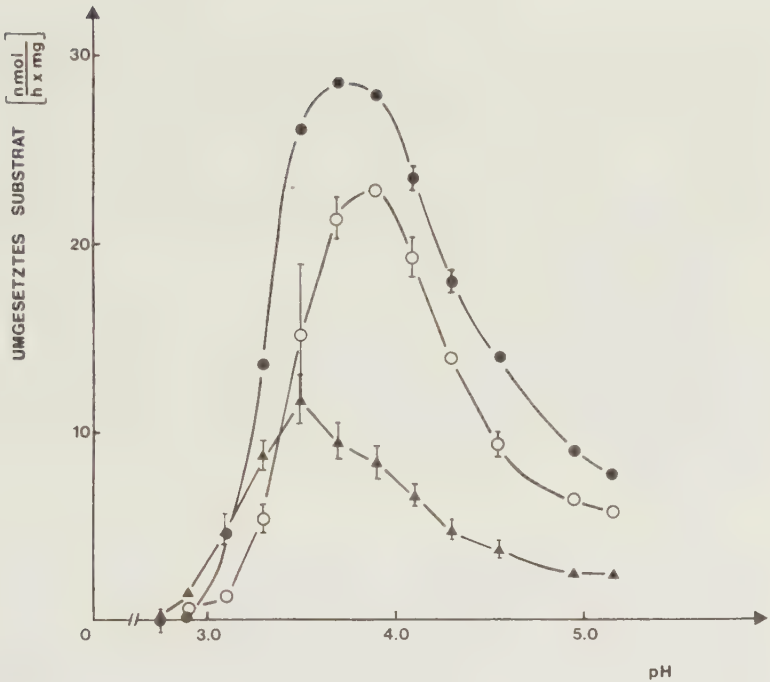


Abb. 3

pH-Abhängigkeit der Substratspaltung durch die membrangebundene Sialidase

● Spaltung von 4-MU-NeuAc

0.1 ml Ansatz enthielten 69 µg mikrosomales Protein (M.D), 0.2 mM 4-MU-NeuAc und 0.1 M Formiatpuffer vom angegebenen pH, jeweils mit NaCl auf eine Endionenstärke von 150 mM ergänzt. Nach halbstündiger Inkubation bei 37° C wurde der Umsatz fluorimetrisch bestimmt (s. Abschnitt 6.3.1.).

○ Spaltung von [³H]-Sialyllactit

0.1 ml Ansatz enthielten 200 µg mikrosomales Protein (M.A), 2 mM [³H]-Sialyllactit und 0.1 M Formiatpuffer vom angegebenen pH, jeweils mit NaCl auf eine Endionenstärke von 150 mM ergänzt. Nach einstündiger Inkubation bei 37° C wurde der Umsatz radiometrisch bestimmt (s. Abschnitt 6.3.2.).

▲ Spaltung von [³H]-Gangliosid G_{D1a}

0.1 ml Ansatz enthielten 100 µg mikrosomales Protein (M.A), 0.1 mM [³H]-Gangliosid G_{D1a} und 0.1 mM Formiatpuffer vom angegebenen pH, jeweils mit NaCl auf eine Endionenstärke von 150 mM ergänzt. Nach einstündiger Inkubation bei 37° C wurde der Umsatz radiometrisch bestimmt (s. Abschnitt 6.3.3.).

Angegeben sind jeweils die Mittelwerte von Doppelbestimmungen, die Standardabweichungen sind eingezeichnet.

linear an bis etwa 0.2 mg mikrosomalem Protein pro Ansatz (Abb. 4). Der zeitliche Verlauf der Produktfreisetzung (Abb. 5) war im Fall von Gangliosid G_{D1a} linear bis ca. 1 h (bei längeren Inkubationszeiten deutliche Substratverknappung unter den gewählten Testbedingungen), im Fall von 4-M'-NeuAc bis mindestens 2 h. Der Zusatz von 0.2% Triton X-100 zu den Ansätzen galt einer möglichst guten Wechselwirkung zwischen der membrangebundenen Sialidase und dem mizellaren Gangliosidsubstrat, während die Vorinkubation einen Einfluß endogener Substrate ausschließen sollte.

Auf Grund der dargestellten Ergebnisse wurde der Test der membrangebundenen Sialidase in der Regel durch halb- bis einstündige Inkubation von 0.05 bis 0.1 mg mikrosomalem Protein mit dem gewünschten Substrat bei 37° C und pH 3.6 durchgeführt. Der pH-Wert von 4.2 bei einigen wenigen Versuchsreihen beruht auf den früher im Arbeitskreis üblichen Inkubationsbedingungen (223, 208).

2.2. Untersuchungen zur Stabilität der Sialidase

Anschließend an die kurze Charakterisierung der verwendeten Sialidasepräparation und der wichtigsten Testbedingungen stellt sich nun die Frage nach der Stabilität und Lagerfähigkeit der Sialidase, die wegen der umfangreichen Versuchsreihen sowie der Verlässlichkeit und Vergleichbarkeit der Daten von großer Bedeutung ist. In der Literatur wird die membrangebundene Sialidase aus Kalbshirn zwar als recht stabil beschrieben (z.B. 186), doch mußte dies für die verwendete Sialidasepräparation und unter den verschiedenen Lager- und Inkubationsbedingungen überprüft werden, um Artefakte auszuschließen.

2.2.1. Stabilität der Sialidase gegen Einfrieren und tiefgefrorene Lagerung

Eine Lagerung der sialidasehaltigen mikrosomalen Membranen im tiefgefrorenen Zustand erschien als die schonendste und bequemste Methode, diese über längere Zeit in möglichst unverändertem Zustand aufzubewahren (207, 208). Eigene Experimente ergaben, daß eine Lagerung der Kalbshirnmikrosomen über Wochen und Monate die Sialidaseaktivität unter identischen Testbedingungen nicht veränderte. Selbst im Verlauf mehrerer Jahre ließ sich für eine Mikrosomenpräparation kein nennenswerter Aktivitätsverlust mit Gangliosid G_{D1a}

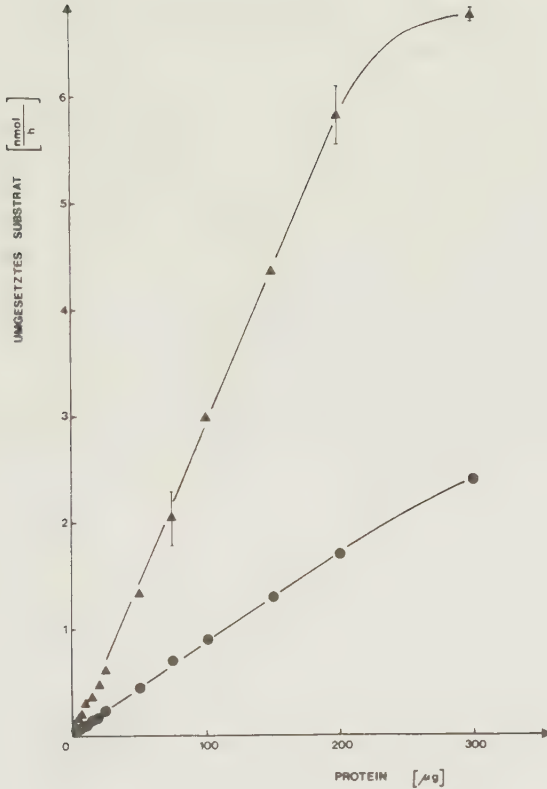


Abb. 4

Abhängigkeit des Substratumsatzes von der eingesetzten Menge an membrangebundener Sialidase

0.1 ml Ansatz enthielten die angegebene Menge mikrosomales Protein (M.C), 0.2 mM 4-MU-NeuAc (●) bzw. 0.1 mM [³H]-Gangliosid G_{01a} (▲), 0.1 M Acetatpuffer pH 4.2, 5 mM Ca²⁺ und NaCl entsprechend einer Endionenstärke von 150 mM. Die Ansätze mit Gangliosidsubstrat enthielten außerdem 0.2% (w/v) Triton X-100. Nach einstündiger Inkubation bei 37° C wurde der Abbau von 4-MU-NeuAc fluorimetrisch und der Gangliosidabbau radiometrisch bestimmt (s. Abschnitt 6.3.1. und 6.3.3.).

Angegeben sind jeweils die Mittelwerte von Doppelbestimmungen, die Standardabweichungen sind eingezeichnet.

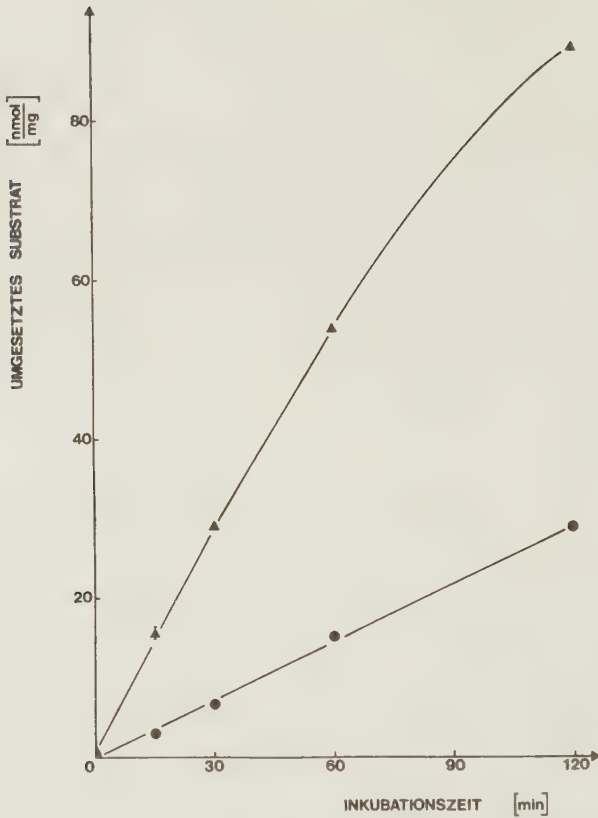


Abb. 5

Zeitabhängigkeit des Substratumsatzes durch die membrangebundene Sialidase

0.1 ml Ansatz enthielten 100 µg mikrosomales Protein (M.E bzw. M.F), 0.2 mM 4-MU-NeuAc (●) bzw. 0.1 mM [^3H]-Gangliosid 6_{1a} (▲), 0.2% (w/v) Triton X-100 und 50 mM Formiatpuffer pH 3.6 (23 mM Endionenstärke). Nach verschieden langer Inkubation bei 37° C wurde der Substratumsatz fluorimetrisch bzw. radiometrisch ermittelt (s. Abschnitt 6.3.1. und 6.3.3.)

Im Fall der 4-MU-NeuAc-Spaltung wurden die mikrosomalen Membranen vor dem enzymatischen Test eine Stunde bei 37° C in Abwesenheit des Substrats, also nur im tritonhaltigen Puffer, vorinkubiert.

Angegeben sind die Mittelwerte von Doppelbestimmungen, die Standardabweichungen sind eingezeichnet.

als Substrat nachweisen; von Mal zu Mal auftretende Unterschiede in den Ergebnissen wiesen keine eindeutige Tendenz auf und sind vermutlich auf die verschiedenen als Substrat verwendeten Gangliosidpräparationen zurückzuführen.

Eine Überraschung ergab sich dagegen bei Untersuchungen zum Einfluß des Einfriervorganges selbst auf die Aktivität der membrangebundenen Sialidase, also bei einem Vergleich einer frisch isolierten, auf Eis aufbewahrten Mikrosomenpräparation mit der gleichen Präparation nach Einfrieren und Auftauen (Tab. 2). Der Gangliosidumsatz wurde durch den Vorgang des Einfrierens auf den gut vierfachen Wert beschleunigt, während sich der Abbau des wasserlöslichen Substrats 4-MU-NeuAc nur leicht erhöhte. Nochmaliges Einfrieren und Auftauen veränderte im Vergleich dazu den Umsatz beider Substrate nur mehr geringfügig und in ähnlichem Ausmaß. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu den Arbeiten von Preti et. al. (186), die durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen unter verschiedenen Bedingungen keine

Tab. 2

Einfluß des Einfrierens und Auftauens der Sialidasepräparation auf den Umsatz der Substrate 4-MU-NeuAc und Gangliosid G_{D1a}

0.1 ml Ansatz enthielten 116 µg mikrosomales Protein (M.E), 0.2 mM 4-MU-NeuAc bzw. 0.1 mM [³H]-Gangliosid G_{D1a}, 0.1 M Formiatpuffer pH 3.6 und NaCl, entsprechend einer Endionenstärke von 150 mM. Nach einstündiger bzw. (*) halbstündiger bzw. (**) 20-minütiger Inkubation bei 37° C, gegebenenfalls im Autoklaven (207) unter einem Lachgasdruck von 30 atm, wurde der Substratumsatz fluorimetrisch bzw. radiometrisch bestimmt (s. Abschnitt 6.3.1. und 6.3.3.). Angegeben sind die Umsatzraten in $\frac{\text{nmol}}{\text{h} \cdot \text{mg}}$, Mittelwerte von mindestens zwei Bestimmungen, sowie die Standardabweichungen (Ausnahme: der Wert ohne Standardabweichung beruht auf einer Einzelbestimmung).

	Abbau von 4-MU-NeuAc unter Lachgas		Abbau von Gangliosid G _{D1a} unter Lachgas	
Nicht eingefroren	10.26 ± 0.02	4.59	5.22 ± 0.08	29.4 ± 4.5
Einmal eingefroren	11.99 ± 0.01	4.75 ± 0.15	23.2 ± 0.8 ⁺	44.5 ± 0.6 ⁺⁺
Zweimal eingefroren	13.27 ± 0.09	5.27 ± 0.18	27.5 ± 0.3 ⁺	50.1 ± 0.3 ⁺⁺

wesentlichen Veränderungen in der Aktivität der Sialidase gegenüber ihren verschiedenen Substraten feststellen konnten. Allerdings unterschied sich die von diesen Autoren verwendete Sialidasepräparation von der hier benutzten insofern, als sie vor den eigentlichen Versuchen fünf Stunden bei 25° C und pH 4.2 in Gegenwart von 0.3 % Triton X-100 vorinkubiert worden war. Die dabei sicherlich erfolgte Zerstörung der nativen Membranstruktur läßt vermuten, daß der in Tab. 2 gezeigte Effekt des Einfrierens auf den Gangliosidabbau an die zuvor intakte Membranstruktur geknüpft ist, während sich der Abbau des wasserlöslichen Substrats davon unbeeinflußt ähnlich verhält wie von Preti et. al. gefunden. Um dies zu erhärten, sind in Tab. 2 auch die entsprechenden Umsatzraten in Gegenwart des membranfluidisierenden, also die Membranstruktur von vornherein störenden Gases N₂O (209, 208) aufgenommen. In Übereinstimmung mit den Arbeiten von Sandhoff und Pallmann (209, 208) beschleunigte Lachgas die Gangliosidspaltung und hemmte die 4-MU-NeuAc-Spaltung, doch ist in unserem Zusammenhang interessant, daß die in Gegenwart von Lachgas bestimmte Sialidaseaktivität nun auch gegenüber dem Gangliosidsubstrat durch das Einfrieren nur noch mäßig und in ähnlichem Ausmaß wie der Umsatz des wasserlöslichen Substrats gesteigert wurde.

Zusammenfassend läßt sich also festhalten, daß die membrangebundene Sialidase in tiefgefrorenem Zustand nahezu unbegrenzt stabil ist, der Einfriervorgang selbst aber eine Veränderung ihrer Eigenschaften, vermutlich auf Grund einer Veränderung der Membranstruktur, mit sich bringt. Versuche zur genaueren Klärung dieser Veränderungen finden sich in Abschnitt 4.5. Mit ganz wenigen Ausnahmen wurden alle weiteren Experimente mit Kalbshirnmikrosomen durchgeführt, die sofort nach ihrer Präparierung portionsweise eingefroren und nur einmal, nämlich zu Versuchsbeginn, wieder aufgetaut worden waren, um gleiche Ausgangsbedingungen zu gewährleisten.

2.2.2. Stabilität der Sialidase bei verschiedenen Temperaturen

Nicht nur in tiefgefrorenem Zustand, sondern auch als gut gekühlte Suspension in neutralen Pufferlösungen geringer Ionenstärke war die membrangebundene Sialidase bemerkenswert stabil. Bei ununterbrochener Kühlung frisch präparierter Mikrosomen auf Eis waren selbst nach zwei bis vier Wochen noch keine Aktivitätsverluste nachweisbar: z.B. betrug der Gangliosidumsatz durch die gleichen Mikrosomen und unter den gleichen Ansatzbedingungen wie in Tab. 2 nach vierzehntägiger Lagerung der Mikrosomen auf

Eis $12.3 \pm 0.2 \frac{\text{nmol}}{\text{h} \cdot \text{mg}}$, und der 4-MU-NeuAc-Umsatz $10.21 \pm 0.02 \frac{\text{nmol}}{\text{h} \cdot \text{mg}}$. Bei Aufbewahrung im Kühlraum (4 bis 8° C) jedoch büßte die membrangebundene Sialidase binnen 6 Tagen etwa die Hälfte ihrer Aktivität gegenüber Gangliosid G_{D1a} ein, bei 25 und 37° C verringerte sich die "Halbwertszeit" auf ca. 30 bzw. 10 Stunden. Die nach halbstündiger Vorinkubation bei erhöhten, unphysiologischen Temperaturen verbleibende Restaktivität ist in Abb. 6 in Abhängigkeit von der Temperatur dargestellt. Oberhalb 45° C trat während dieser Zeit eine merkliche Inaktivierung und über 55° C völliger Aktivitätsverlust ein. Die durch Vorinkubation bei niedrigeren Temperaturen verursachte leichte Stimulierung der Gangliosidspaltung beruht evtl. wiederum auf einer Veränderung der Membranstruktur (vgl. vorangehenden Abschnitt) oder auf einem Abbau konkurrierender, endogener Substrate (vgl. Einleitung, sowie Abschnitt 2.3.1. und 2.4.1.) während der Vorinkubation.

Die gleiche Ursache dürfte auch hinter den Abweichungen vom parallelen Kurvenverlauf in den Abb. 7 a und 7 b stehen, die den Zeitverlauf der Sialidaseinaktivierung bei 50° C veranschaulichen. Während der ersten 15 min nahm die Aktivität gegenüber dem Gangliosidsubstrat langsamer ab, als gegenüber 4-MU-NeuAc, vermutlich, weil im ersten Fall der Hitzeinaktivierung wiederum ein stimulierender Vorgang überlagert war. Der Versuch wurde daher wiederholt, wobei der Hitzeinaktivierung eine einstündige Inkubation bei 37° C vorgeschaltet wurde, während der die stimulierenden Vorgänge annähernd zum Abschluß kommen sollten. Tatsächlich laufen die Kurven nun nahezu parallel und in der halblogarithmischen Darstellung linear, wie für eine Reaktion erster Ordnung zu erwarten ist (Abb. 8 a,b und c). Aus den Steigungen der beiden letztgenannten Geraden errechnet sich für die thermische Inaktivierung der membrangebundenen Sialidase bei 50° C eine Halbwertszeit von 41 bzw. 45 min, gemessen mit den Substraten 4-MU-NeuAc bzw. Gangliosid G_{D1a}. Diese Ergebnisse stimmen qualitativ gut mit denen von Preti et. al. (186) überein, die mit ihrer bereits erwähnten detergensbehandelten Sialidasepräparation während 15 min bei 55° C einen Aktivitätsverlust von 80 % beobachteten.

Die beachtliche Temperaturresistenz der membrangebundenen Sialidase sollte aber nicht vergessen lassen, daß alle bisher beschriebenen Experimente zur Temperaturstabilität in neutralen Medien geringer Ionenstärke durchgeführt wurden. Unter den Bedingungen des enzymatischen Tests könnte die Sialidase durchaus empfindlicher reagieren. Der nächste Abschnitt befaßt sich daher mit dem Einfluß von pH-Wert und Ionenstärke auf die Stabilität der membrangebundenen Sialidase bei physiologischen Temperaturen.

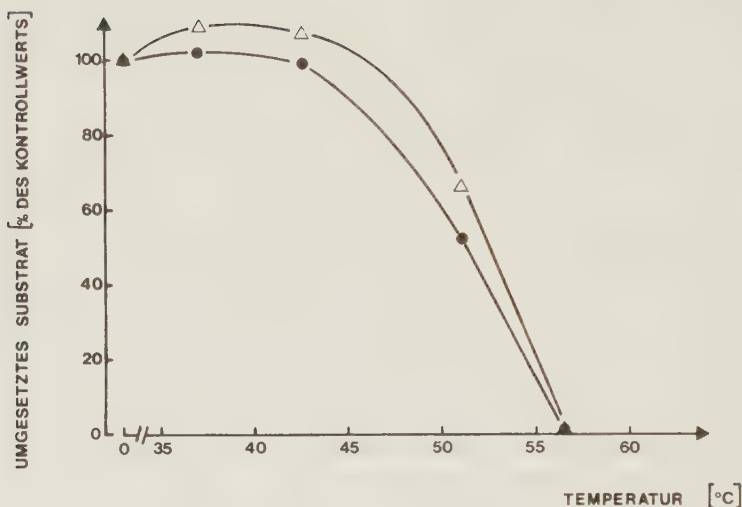


Abb. 6

Inaktivierung der membrangebundenen Sialidase bei erhöhten Temperaturen

Mikrosomale Membranen (M.D) in 0.3 mM Tris/HCl-Puffer pH 7.2 wurden bei den angegebenen Temperaturen 30 min lang vorinkubiert. Der Testansatz für die anschließende Bestimmung der Sialidaseaktivität enthielt in 0.1 ml Endvolumen 100 µg mikrosomales Protein, 0.2 mM 4-MU-NeuAc bzw. 0.1 mM [³H]-Gangliosid G_{D1a} und 0.1 M Acetatpuffer pH 4.2 (Endionenstärke: 26 mM). Nach 67-minütiger Inkubation bei 37° C wurde der Substratsatz fluorimetrisch bzw. radiometrisch bestimmt (s. Abschnitt 6.3.1. und 6.3.3.) und auf den jeweiligen Kontrollwert ("Vorinkubation" auf Eis) bezogen. Angegeben sind die Mittelwerte von Doppelbestimmungen; die Standardabweichungen liegen innerhalb der Größe der Symbole.

● Abbau von 4-MU-NeuAc

△ Abbau von Gangliosid G_{D1a}

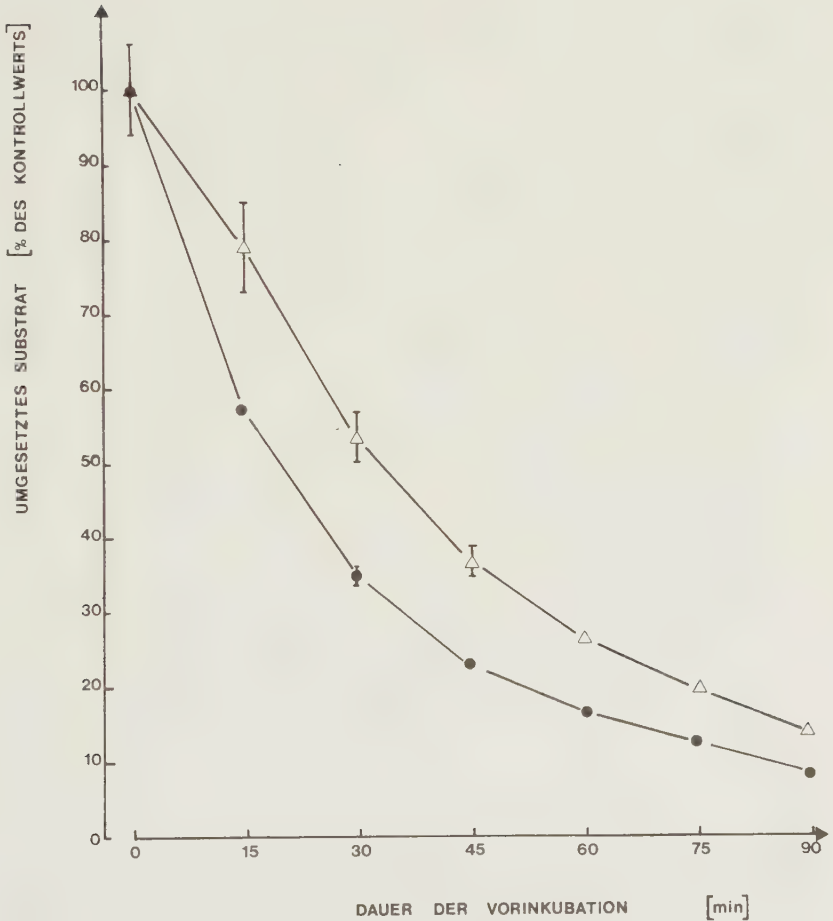


Abb. 7 a

Zeitlicher Verlauf der Inaktivierung der membrangebundenen Sialidase bei 50° C

Mikrosomale Membranen (M.8) in 6.1 mM Tris/HCl-Puffer pH 7.2 wurden bei 50° C die angegebenen Zeiten vorinkubiert. Der Testansatz für die anschließende Bestimmung der Sialidaseaktivität enthielt in 0.1 ml Endvolumen 100 µg mikrosomales Protein, 0.2 mM 4-MU-NeuAc bzw. 0.1 mM [³H]-Gangliosid G_{D1a} und 0.1 M Acetatpuffer pH 4.2 (Endionenstärke: 26 mM). Nach einstündiger Inkubation bei 37° C wurde der Substratumsatz fluorimetrisch bzw. radiometrisch bestimmt (s. Abschnitt 6.3.1. und 6.3.3.) und auf den jeweiligen Kontrollwert ("Vorinkubation" auf Eis) bezogen. Angegeben sind die Mittelwerte von mindestens zwei Bestimmungen, die Standardabweichungen sind eingezeichnet.

● Abbau von 4-MU-NeuAc

△ Abbau von Gangliosid G_{D1a}

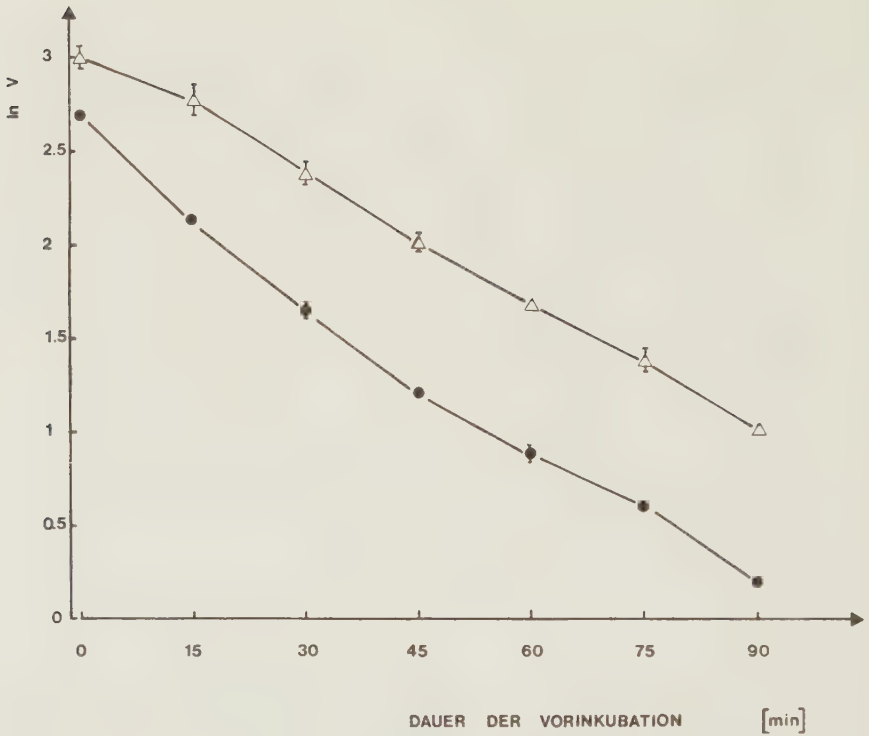


Abb. 7 b

Zeitlicher Verlauf der Inaktivierung der membrangebundenen Sialidase bei 50° C, halblogarithmische Auftragung

Gleiche Daten wie in Abb. 7 a, jedoch wurde der natürliche Logarithmus des Substratumsatzes $V \left(\frac{\text{nmol}}{\text{h} \cdot \text{mg}} \right)$ gegen die Dauer der Vorinkubation aufgetragen.

● Abbau von 4-MU-NeuAc

△ Abbau von Gangliosid G_{01a}

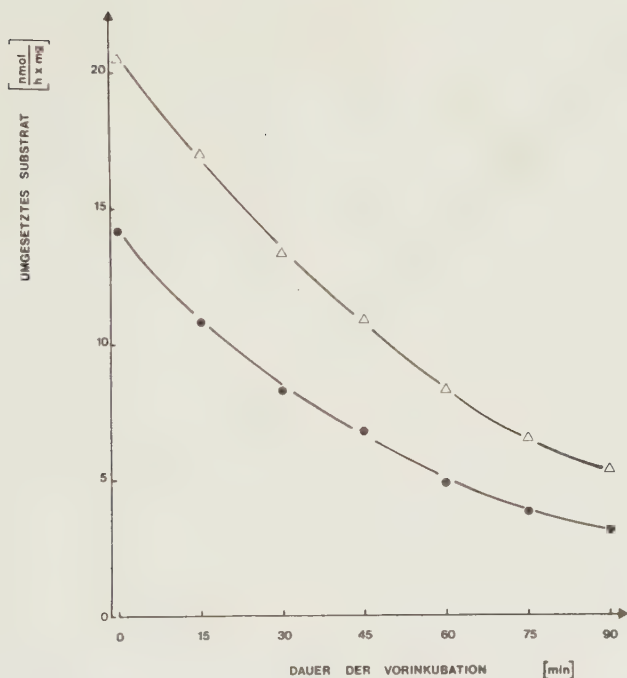


Abb. 8 a

Zeitlicher Verlauf der Inaktivierung der membrangebundenen Sialidase bei 50° C

Mikrosomale Membranen (M.E) in 5.5 mM Tris/HCl-Puffer pH 7.2 wurden erst eine Stunde bei 37° C und anschließend die angegebenen Zeiten bei 50° C vorinkubiert. Der Testansatz für die darauf folgende Bestimmung der Sialidaseaktivität enthielt in 0.1 ml Endvolumen 100 µg mikrosomales Protein, 0.2 mM 4-MU-NeuAc bzw. 0.1 mM [³H]-Gangliosid G_{01a}, 50 mM Formiatpuffer pH 3.6 und NaCl, entsprechend einer Endionenstärke von 150 mM. Nach einstündiger Inkubation bei 37° C wurde der Substratumsatz fluorimetrisch bzw. radiometrisch bestimmt (s. Abschnitt 6.3.1. und 6.3.3.). Angegeben sind die Mittelwerte von Doppelbestimmungen, die Standardabweichungen liegen innerhalb der Größe der Symbole.

● Abbau von 4-MU-NeuAc

△ Abbau von Gangliosid G_{01a}

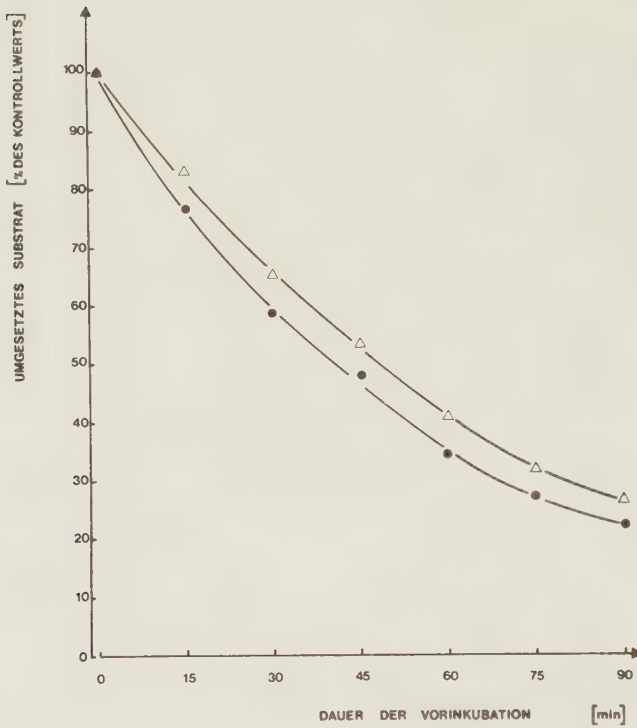


Abb. 8 b

Zeitlicher Verlauf der Inaktivierung der membrangebundenen Sialidase bei 50° C

Gleiche Daten wie Abb. 8 a, jedoch wurden die Umsätze auf den jeweiligen Kontrollwert (keine Vorinkubation bei 50° C) bezogen.

● Abbau von 4-MU-NeuAc

Abbau von Gangliosid G_{D1a}

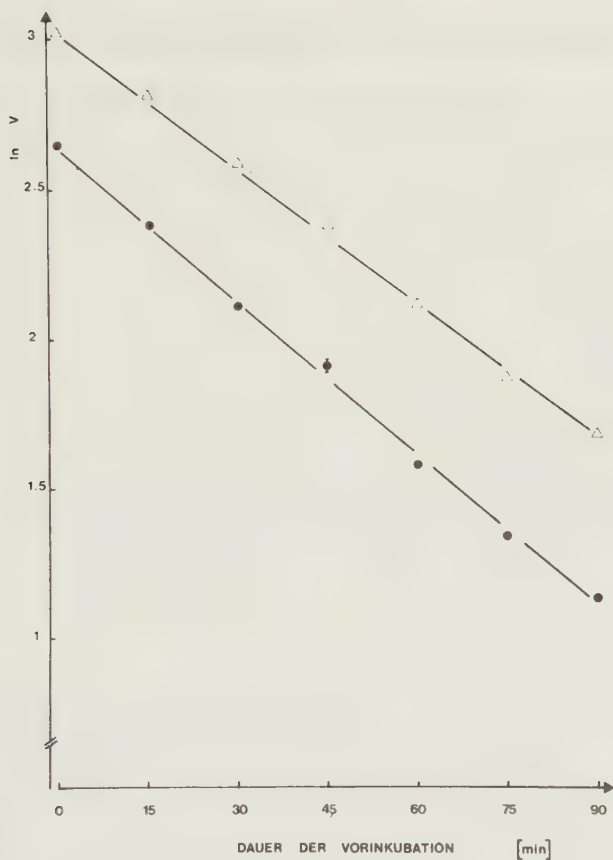


Abb. 8 c

Zeitlicher Verlauf der Inaktivierung der membrangebundenen Sialidase bei 50° C, halblogarithmische Auftragung

Gleiche Daten wie Abb. 8 a, jedoch wurde der natürliche Logarithmus des Substratsatzes $V \left(\frac{\text{nmol}}{\text{h-mg}} \right)$ gegen die Dauer der Vorinkubation aufgetragen.

● Abbau von 4-MU-NeuAc

Abbau von Gangliosid G_{01a}

2.2.3. Stabilität der Sialidase bei verschiedenen pH-Werten und Ionenstärken

Am vordringlichsten und interessantesten ist sicherlich zu wissen, wie stabil die membrangebundene Sialidase unter den "normalen" Inkubationsbedingungen ist. Daher wurden mikrosomale Membranen bei 37° C und pH 3.6 in Puffern niedriger und physiologischer Ionenstärke (150 mM) vorinkubiert und anschließend im einheitlichen Inkubationsansatz auf ihre Sialidaseaktivität getestet. Dabei ergab sich überraschenderweise, daß beim optimalen pH-Wert von 3.6 und in Gegenwart physiologischer Ionenstärke die membrangebundene Sialidase innerhalb einer Stunde den Großteil ihrer Aktivität sowohl gegenüber dem wasserlöslichen als auch gegenüber dem lipophilen Substrat verlor (Abb. 9 a). Ein Zusatz von 0.2 % Triton X-100 zum Vorinkubationsansatz hatte keinen wesentlichen Einfluß auf die Stabilität, die folglich unabhängig von der intakten Membranstruktur zu sein scheint. Dagegen bewirkte eine Verringerung der Ionenstärke von 150 auf 23 mM eine Verlängerung der Halbwertszeit für den Inaktivierungsprozeß von etwa 30 bis 40 min auf über drei Stunden. Bei pH 5 jedoch war das Enzym selbst bei einer Ionenstärke von 150 mM bis 24 Stunden völlig stabil. (Anmerkung: Die bei dieser und auch anderen Kurven bei kurzen Vorinkubationszeiten auftretende Stimulierung des Gangliosidsatzes ist ihrer Natur nach sehr wahrscheinlich mit derjenigen identisch, die bereits im vorangehenden Abschnitt beschrieben und diskutiert wurde.) Das gab den Anstoß, den pH-Einfluß auf die Inaktivierungsgeschwindigkeit systematisch zu untersuchen. Die Abb. 9 b und c veranschaulichen, daß die Sialidase bei pH 5 bis 6 offenbar ein Optimum in ihrer Stabilität aufweist, da sie sowohl bei pH 7 als auch bei pH 3.6 wesentlich schneller inaktiviert wurde. Eine darüber hinausgehende, nur geringfügige Erhöhung oder Erniedrigung des pH-Wertes führte dann bereits zu einem rapiden Aktivitätsverlust in wenigen Minuten.

Die hier beobachtete große Instabilität der membrangebundenen Sialidase bei pH 3.6 steht nun in gewissem Widerspruch zu dem in Abschnitt 2.1.3. gezeigten Zeitverlauf des sialidasekatalysierten Substratsatzes (Abb. 5), der ja indirekt ebenfalls Aufschluß gibt über die Stabilität des Enzyms. Dort waren - allerdings bei der niedrigen Ionenstärke von 23 mM - über einen Zeitraum von zwei Stunden keine Anzeichen für größere Aktivitätseinbußen erhalten worden. Die in anderem Zusammenhang in Abschnitt 4.1. besprochene Zeitabhängigkeit der Gangliosidspaltung in Gegenwart einer Ionen-

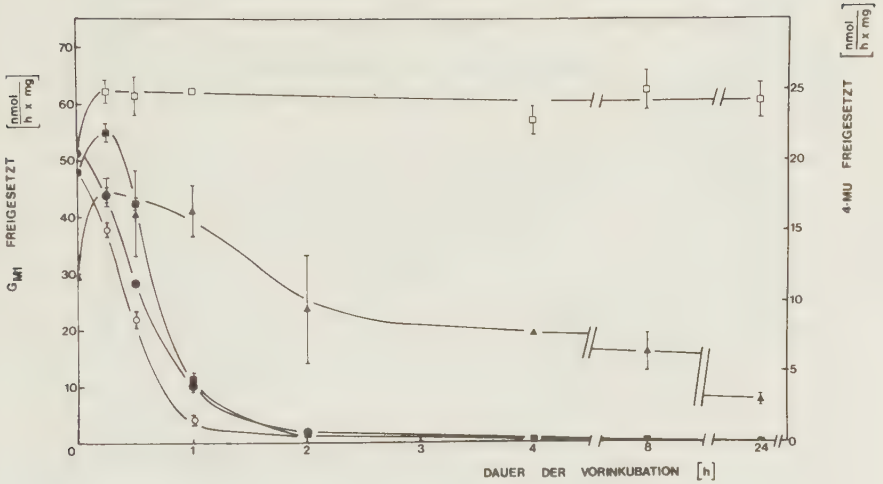


Abb. 9 a

Zeitlicher Verlauf der Inaktivierung der membrangebundenen Sialidase bei verschiedenen pH-Werten und Ionenstärken

Mikrosomale Membranen (M.G) wurden die in der Abbildung angegebenen Zeiten bei 37° C in Gegenwart verschiedener Pufferlösungen vorinkubiert. Der Testansatz für die anschließende Bestimmung der Sialidaseaktivität enthielt in 0.1 ml Endvolumen 100 µg mikrosomales Protein, 0.2 mM 4-MU-NeuAc bzw. 0.1 mM [³H]-Gangliosid G_{D1a}, 0.1 % Triton X-100, 50 mM (im Fall der Vorinkubation bei pH 5.0: 59 mM) Formiatpuffer pH 3.6 und z.T. auch NaCl, wenn die Endionenstärke über 23 mM lag. Die Endionenstärke betrug im Fall der Vorinkubation bei 23 mM Ionenstärke ebenfalls 23 mM, im Fall der Vorinkubation bei 150 mM Ionenstärke dagegen 43 mM. Nach einstündiger Inkubation bei 37° C wurde der Substratumsatz fluorimetrisch bzw. radio-metrisch bestimmt (s. Abschnitt 6.3.1. und 6.3.3.). Angegeben sind die Mittelwerte von Doppelbestimmungen, die Standardabweichungen sind eingezeichnet. Vorinkubiert wurde in folgenden Pufferlösungen, deren Ionenstärke I gegebenenfalls mit NaCl auf den angegebenen Wert gebracht worden war:

- 50 mM Formiatpuffer pH 3.6, I = 150 mM (NaCl), 4-MU-NeuAc als Substrat
- 50 mM Formiatpuffer pH 3.6, I = 150 mM (NaCl), Gangliosid G_{D1a} als Substrat
- 50 mM Formiatpuffer pH 3.6, I = 150 mM (NaCl), 0.2 % Triton X-100, Gangliosid G_{D1a} als Substrat
- ▲ 50 mM Formiatpuffer pH 3.6, I = 23 mM, Gangliosid G_{D1a} als Substrat
- 100 mM Formiatpuffer pH 5.0, I = 150 mM (NaCl), Gangliosid G_{D1a} als Substrat

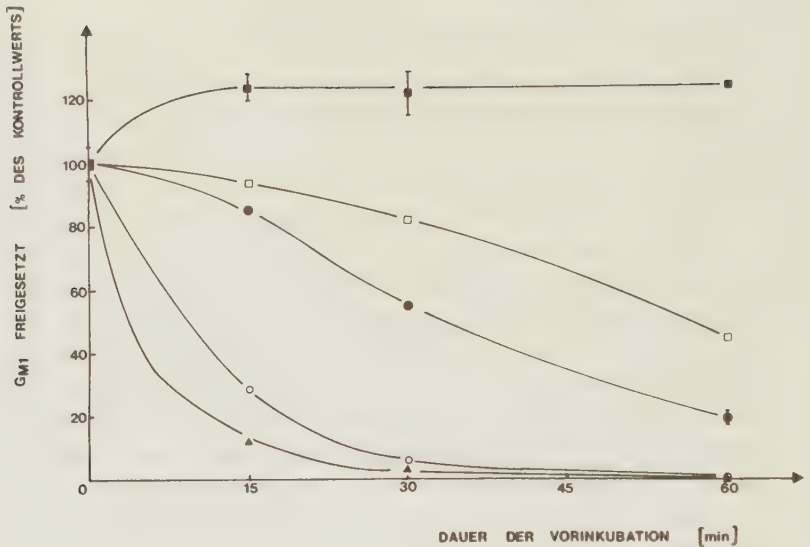


Abb. 9 b

Zeitlicher Verlauf der Inaktivierung der membrangebundenen Sialidase bei verschiedenen pH-Werten und einer konstanten Ionenstärke von 150 mM

● Vorinkubation in 50 mM Formiatpuffer pH 3.6

■ Vorinkubation in 100 mM Formiatpuffer pH 5.0

Die Werte wurden aus Abb. 9 a übernommen und lediglich auf den jeweiligen Ausgangswert ohne Vorinkubation bezogen.

○ Vorinkubation in 100 mM Formiatpuffer pH 2.95

□ Vorinkubation in 50 mM Maleatpuffer pH 7.0

▲ Vorinkubation in 50 mM Tris/HCl-Puffer pH 7.8

Mikrosomale Membranen (M.E.) wurden für die in der Abbildung angegebenen Zeiten bei 37° C in Gegenwart der verschiedenen Pufferlösungen vorinkubiert. Der Testansatz für die anschließende Bestimmung der Sialidaseaktivität enthielt in 0.1 ml Endvolumen 100 µg mikrosomales Protein, 0.1 mM [³H]-Gangliosid G_{1a}, 0.1% Triton X-100, 45 mM Formiatpuffer pH 3.6 und NaCl entsprechend einer Endionenstärke von 150 mM. Abweichend hiervon enthielten Ansätze, die bei pH 2.95 vorinkubiert worden waren, kein Triton und 55 mM Formiatpuffer pH 3.6. Nach einstündiger Inkubation bei 37° C wurde der Substratsatz radiometrisch ermittelt (s. Abschnitt 6.3.3.) und auf den jeweiligen Ausgangswert ohne Vorinkubation bezogen. Angegeben sind die Mittelwerte von Doppelbestimmungen, die Standardabweichungen liegen innerhalb der Größe der Symbole.

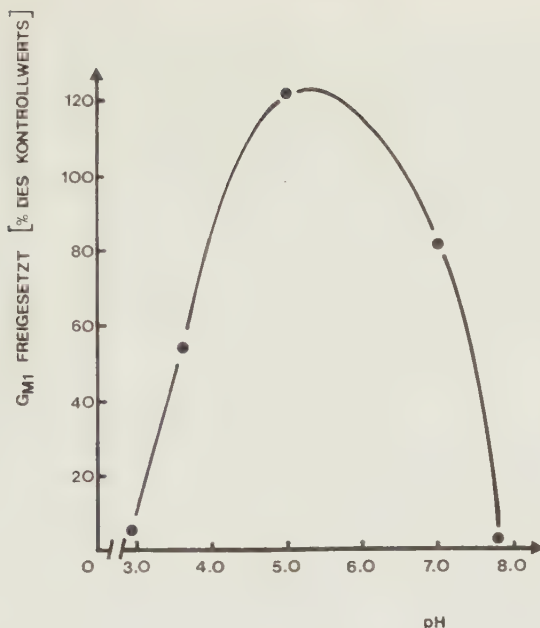


Abb. 9 c

Inaktivierung der membrangebundenen Sialidase in Abhängigkeit vom pH-Wert bei einer konstanten Ionenstärke von 150 mM

Die bei einer Vorinkubationsdauer von 30 min gewonnenen Daten aus Abb. 9 b wurden gegen den pH-Wert während der Vorinkubation aufgetragen.

stärke von 150 mM (Abb. 31) läßt zwar schon nach einer Stunde einen erheblichen Aktivitätsverlust erkennen, aber nicht in dem Ausmaß, wie von den Flächen unter der entsprechenden Kurve in Abb. 9 a her zu erwarten wäre. Im Unterschied zu den in diesem Kapitel vorgestellten Versuchen fallen jedoch bei den Zeitabhängigkeiten Vorinkubation und Testinkubation zusammen, d.h., die Ergebnisse sind Ausdruck der Sialidasestabilität in Gegenwart ihrer Substrate. Letztere könnten, wie dies von anderen Enzymen und Bindungsproteinen her bekannt ist (vgl. 50), durchaus stabilisierend auf die Sialidase wirken.

Insgesamt muß aber aus der in den beschriebenen Experimenten festgestellten starken Abhängigkeit der Sialidasestabilität von pH-Wert und Ionenstärke der Schluß gezogen werden, daß diesbezüglich die Standardinkubations-

bedingungen nicht günstig gewählt sind. Wenn sie dennoch beibehalten wurden, so deswegen, weil bei pH 3.6 trotz der während der Inkubation auftretenden Enzyminaktivierung maximale Abbaugeschwindigkeit erzielt wurde (vgl. Abschnitt 2.1.3.). Außerdem sollte der Aktivitätsverlust bei konstanter Inkubationszeit für alle Ansätze einer Versuchsreihe gleich sein und die Gesamtaussage in der Regel nicht beeinflussen.

Im Anschluß an diese Studien zum Einfluß der Testbedingungen auf die Stabilität der Sialidase soll nun in den beiden nächsten Abschnitten über Experimente berichtet werden, die ursprünglich in Zusammenhang mit Versuchen zu einer weiteren Reinigung der membrangebundenen Sialidase konzipiert worden waren, inhaltlich aber ebenfalls hierher gehören. Will man ein Membranprotein reinigen, so muß es erst aus dem Membranverband herausgelöst werden. Zwei der häufig dazu verwendeten Methoden bestehen in einer selektiven Proteolyse, falls das Protein nur mit einem kleineren, abspaltbaren, hydrophoben Anteil in der Membran verankert ist (z.B. 138), oder in einer Auflösung der Membran mit Hilfe von Detergentien (z.B. Ü 80, Ü 33). In beiden Fällen muß natürlich sichergestellt werden, daß das zu reinigende Protein selbst dabei nicht oder nur wenig geschädigt wird. Diesbezügliche Versuche für die membrangebundene Sialidase sind im Folgenden beschrieben.

2.2.4. Stabilität der Sialidase gegen Proteasen

Wenn eine möglichst schonende und selektive Proteolyse erzielt werden soll, wird dazu als Protease am häufigsten das Trypsin benutzt, und so wurde es - neben Chymotrypsin (s.u.) - auch für die hier beabsichtigten Untersuchungen ausgewählt. Mikrosomale Membranen wurden verschiedene Zeiten in Gegenwart von Trypsin bei 37° C und pH 7.2 vorinkubiert und anschließend nach Zugabe von Trypsininhibitor auf Sialidaseaktivität getestet (Abb. 10). Für die beiden Substrate 4-MU-NeuAc und Gangliosid G_{D1a} ergab sich ein unterschiedlicher Kurvenverlauf, der wiederum auf der in früheren Abschnitten bereits beobachteten Stimulierung des Gangliosidabbaus während der ersten 10 bis 15 min der Vorinkubation beruhte. Anschließend war auch hier wie im Fall des wasserlöslichen Substrats eine fortschreitende langsame Inaktivierung erkennbar. Die Sialidaseaktivität gegenüber 4-MU-NeuAc sank innerhalb von zweieinhalb Stunden Vorinkubation auf etwa den halben Wert. Für die anfängliche Steigerung der Gangliosid-

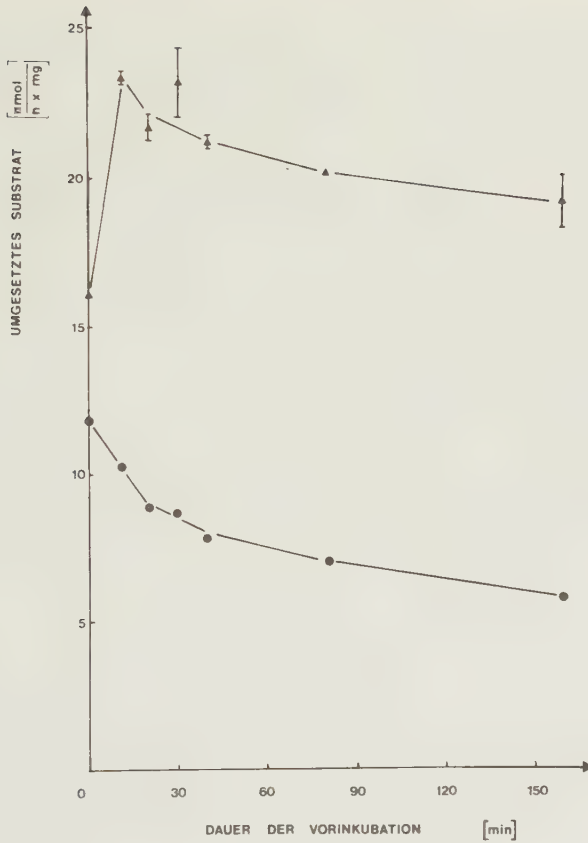


Abb. 10

Zeitlicher Verlauf der Inaktivierung der membrangebundenen Sialidase durch Proteolyse mit Trypsin

Mikrosomale Membranen (M.E.) in 2.5 mM Tris/HCl-Puffer pH 7.2 wurden bei 37° C in Gegenwart von $\frac{1 \text{ mg}}{\text{ml}}$ Trypsin (Gewichtsverhältnis Trypsin zu mikrosomalem Protein wie 1 : 5) die angegebenen Zeiten vorinkubiert. Der Testansatz für die darauf folgende Bestimmung der Sialidaseaktivität enthielt in 0.1 ml Endvolumen 100 µg mikrosomales Protein, 20 µg Trypsin, 20 µg Trypsininhibitor, 0.2 mM 4-MU-Neu-Ac bzw. 0.1 mM [^3H]-Gangliosid GD_{1a} , 50 mM Formiatpuffer pH 3.6 und NaCl, entsprechend einer Endionenstärke von 150 mM. Nach einstündiger Inkubation bei 37° C wurde der Substratumsatz fluorimetrisch bzw. radiometrisch bestimmt (s. Abschnitt 6.3.1. und 6.3.3.). Angegeben sind die Mittelwerte von Doppelbestimmungen, die Standardabweichungen sind eingezeichnet.

● Abbau von 4-MU-NeuAc

▲ Abbau von Gangliosid GD_{1a}

spaltung könnte neben den in Abschnitt 2.2.2. gegebenen Erklärungen zusätzlich eine infolge der Proteolyse erleichterte Zugänglichkeit der Sialidase für das Mizellare Substrat eine Rolle spielen. Kontrollversuche zur Wirksamkeit des Trypsininhibitors ergaben, daß er unter den eingehaltenen Bedingungen die Trypsinwirkung tatsächlich vollständig aufhob: Vorinkubation bei pH 7.2 in Gegenwart von Trypsin und Trypsininhibitor verursachte keine Aktivitätsverluste. Darüber hinaus zeigten andere Kontrollansätze, daß die Anwesenheit von Trypsin im Testansatz die Sialidaseaktivität ohnehin nicht mehr veränderte. Aufgrund seines pH-Optimums in der Gegend von pH 7.6 ist das Trypsin beim Inkubations-pH von 3.6 offenbar völlig inaktiv und macht eine Zugabe von Trypsininhibitor überflüssig.

In einem weiteren Experiment wurden mikrosomale Membranen mit steigenden Mengen an Protease - diesmal wurde neben Trypsin auch Chymotrypsin eingesetzt - eine Stunde vorinkubiert und dann auf Sialidaseaktivität getestet (Abb. 11). Beide Proteasen hatten recht ähnliche inaktivierende Wirkung und konnten den Substratumsatz höchstens um 50 % verringern, bei einem 1 : 1-Verhältnis (w/w) von Protease zu mikrosomalem Protein. Lediglich größere Trypsinmengen stimulierten hiervon abweichend die Gangliosidspaltung. Eine Wiederholung der entsprechenden Ansätze ergab aber widersprüchliche Ergebnisse, so daß die in Abb. 11 gezeigte Stimulierung möglicherweise auf einem unbekannten Artefakt beruht, dem nicht weiter nachgegangen wurde. Es stellte sich nämlich heraus, daß nach halbstündiger Vorinkubation mit $1 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ Trypsin bei pH 7.2 und darauf folgender Pelletierung der mikrosomalen Membranen bei 100 000 g der Überstand keine Sialidaseaktivität enthielt. Stattdessen fand sich nahezu die gesamte Ausgangsaktivität im Pellet wieder. Das erhärtet die öfter geäußerte Vermutung, daß die Sialidase aus Kalbshirn als fest gebundener, integraler Bestandteil der Membranen vorliegt. So blieb als gangbarer Weg für eine Reinigung nur der Einsatz von Detergentien übrig.

2.2.5. Stabilität der Sialidase gegen Detergentien

Aus früheren Arbeiten in unserem Arbeitskreis war bereits bekannt, daß die Sialidase aus Kalbshirn in tritonhaltiger Lösung innerhalb eines Tages bei 0° C die Hälfte ihrer Aktivität einbüßt (174), in Gegenwart des ebenfalls nichtionischen Detergens n-Octyl- β -D-glucopyranosid (Octylglucosid)

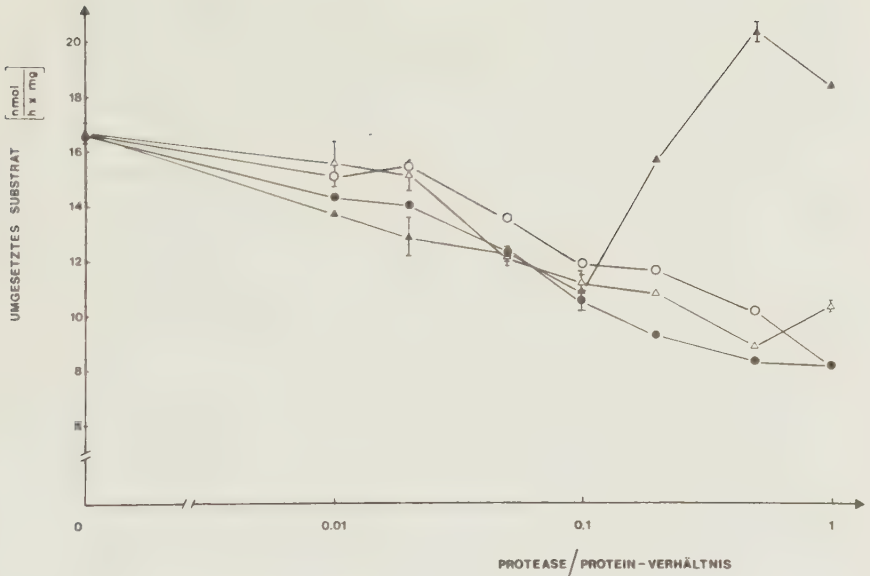


Abb. 11

Inaktivierung der membrangebundenen Sialidase durch steigende Mengen der Proteasen Trypsin und Chymotrypsin

Mikrosomale Membranen ($M.F.$) in 2.6 bis 7.2 mM Tris/HCl-Puffer pH 7.2 (Konzentration an mikrosomalem Protein: $2 \frac{mg}{ml}$) wurden in Gegenwart steigender Mengen an Trypsin bzw. Chymotrypsin (angegeben als Gewichtsverhältnis Protease zu mikrosomalem Protein) eine Stunde bei 37° C vorinkubiert. Der Testansatz für die darauf folgende Bestimmung der Sialidaseaktivität enthielt in 0.1 ml Endvolumen 100 µg mikrosomales Protein, 0 bis 100 µg Protease, 0.2 mM 4-MU-NeuAc bzw. 0.1 mM [3H]-Gangliosid G_{D1a}, 50 mM Formiatpuffer pH 3.6 und NaCl entsprechend einer Endionenstärke von 150 mM. Nach einstündiger Inkubation bei 37° C wurde der Substratumsatz fluorimetrisch bzw. radiometrisch ermittelt (s. Abschnitt 6.3.1. und 6.3.3.). Angegeben sind die Mittelwerte von Doppelbestimmungen, die Standardabweichungen sind eingezeichnet.

- Vorinkubation in Gegenwart von Trypsin, 4-MU-NeuAc als Substrat
- ▲ Vorinkubation in Gegenwart von Trypsin, Gangliosid G_{D1a} als Substrat
- Vorinkubation in Gegenwart von Chymotrypsin, 4-MU-NeuAc als Substrat
- △ Vorinkubation in Gegenwart von Chymotrypsin, Gangliosid G_{D1a} als Substrat

jedoch mindestens über zwei Tage stabil ist (175). Da aber andere Arbeitsgruppen bei ähnlichen Problemstellungen gute Erfahrungen mit Triton X-100 gemacht hatten (z.B. 282, 157, 171) und auch dieses Detergens von den physikochemischen Eigenschaften her nur geringe Neigung zur Proteindenaturierung aufweisen sollte (Ü 81), wurde die Stabilität der membrangebundenen Sialidase gegenüber beiden Detergentien in direktem Vergleich nochmals untersucht. Zudem hatten eigene Vorversuche nach fast fünftägiger Aufbewahrung von Mikrosomen in 1 %iger Tritonlösung bei 4° C keinerlei Enzymverluste erkennen lassen. In Abb. 12 a und b ist nun die Sialidaseaktivität gegen die Dauer der Vorinkubation bei 37° C in Gegenwart von Triton X-100 bzw. Octylglucosid aufgetragen, wobei die Detergensenkonzentrationen jeweils ein Vielfaches der kritischen Mizellkonzentration von 0.3 bzw. 25 mM (Ü81) betrugen. Besonders Abb. 12 b veranschaulicht sehr übersichtlich, daß Octylglucosid die Sialidase mit einer Halbwertszeit von gut einer Stunde inaktivierte, unabhängig davon, welches Substrat zum enzymatischen Test eingesetzt wurde. Vorinkubation in tritonhaltiger Lösung dagegen bewirkte anfänglich eine Stimulierung des Umsatzes beider Substrate, die erst nach ein bis zwei Stunden in eine leichte Inaktivierung mit einer grob abgeschätzten Halbwertszeit von über zehn Stunden überging. Im Widerspruch zu den oben erwähnten Arbeiten folgt also aus einem direkten Vergleich beider Detergentien eine wesentlich größere Stabilität der Sialidase in Gegenwart von Triton X-100, wie von dessen niedrigerer kritischer Mizellkonzentration her zu erwarten war (Ü 80). Über die Ursachen der infolge einer Vorinkubation in tritonhaltiger Lösung auftretenden Stimulierung des Substratumsatzes kann wieder nur spekuliert werden. Eventuell tritt mit der Zeit eine zunehmende Dispergierung und Gleichverteilung der Sialidase-moleküle ein, wodurch endogene, konkurrierende Substrate verdünnt und die zugesetzten Substrate vom Enzym besser erreicht werden können. Auch ein Abbau konkurrierender, endogener Substrate während der Vorinkubation erscheint im Licht späterer Befunde als wahrscheinlich (vgl. Abschnitt 2.4.1.). Solche Einflüsse der Art der Aggregate, in denen sowohl die Sialidase als auch das Gangliosidsubstrat vorliegen, auf die Geschwindigkeit der Substratspaltung sind Gegenstand des nächsten Kapitels.

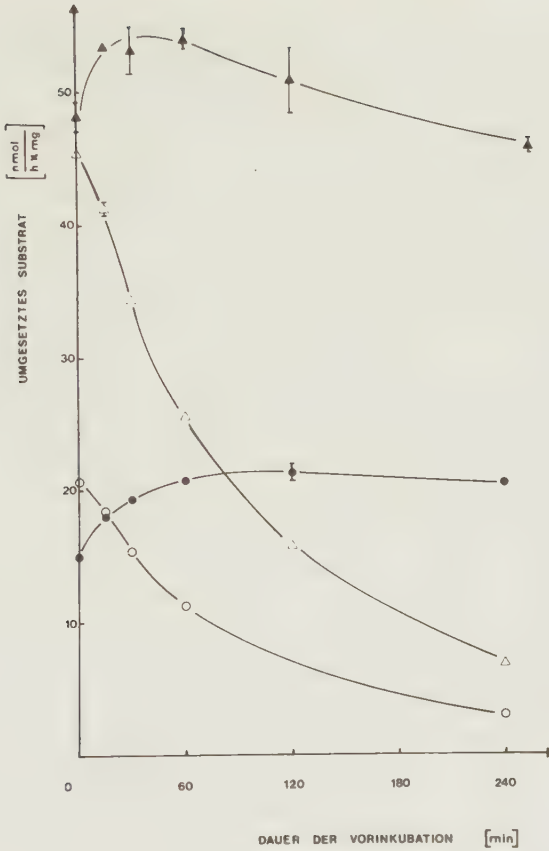


Abb. 12 a

Zeitlicher Verlauf der Inaktivierung der membrangebundenen Sialidase durch die Detergentien Triton X-100 und n-Octyl- β -D-glucopyranosid

Mikrosomale Membranen (M.E.) in 0.25 mM Tris/HCl-Puffer pH 7.2 (Konzentration an mikrosomalem Protein: $5 \frac{mg}{ml}$) wurden in Gegenwart von 1% (w/v) Triton X-100 (≈ 16 mM) bzw. 150 mM n-Octyl- β -D-glucopyranosid die angegebenen Zeiten bei 37° C vorinkubiert. Der Testansatz für die darauf folgende Bestimmung der Sialidaseaktivität enthielt in 0.1 ml Endvolumen 100 μ g mikrosomales Protein, 0.2% (w/v) Triton X-100 bzw. 30 mM Octylglucosid, 0.2 mM 4-MU-NeuAc bzw. 0.1 mM [3H]-Gangliosid G_{01a} und 50 mM Formiatpuffer pH 3.6 (Endionenstärke: 23 mM). Nach einstündiger Inkubation bei 37° C wurde der Substratumsatz fluorimetrisch bzw. radio-metrisch ermittelt (s. Abschnitt 6.3.1. und 6.3.3.). Angegeben sind die Mittelwerte von Doppelbestimmungen, die Standardabweichungen sind eingezeichnet.

- Vorinkubation in Gegenwart von Triton X-100, 4-MU-NeuAc als Substrat
- ▲ Vorinkubation in Gegenwart von Triton X-100, Gangliosid G_{01a} als Substrat
- Vorinkubation in Gegenwart von Octylglucosid, 4-MU-NeuAc als Substrat
- △ Vorinkubation in Gegenwart von Octylglucosid, Gangliosid G_{01a} als Substrat

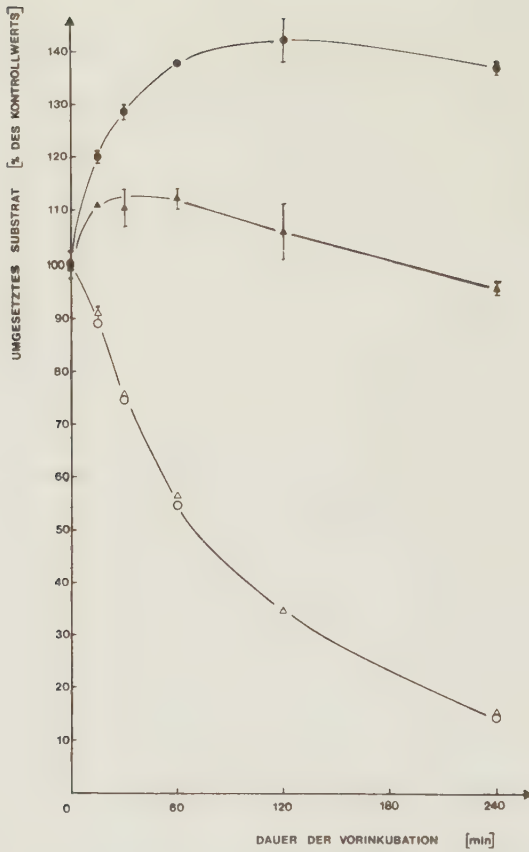


Abb. 12 b

Zeitlicher Verlauf der Inaktivierung der membrangebundenen Sialidase durch die Detergentien Triton X-100 und n-Octyl- β -D-glucopyranosid

Gleiche Daten wie Abb. 12 a, jedoch wurden die Umsätze auf den jeweiligen Kontrollwert ohne Vorinkubation bezogen.

- Vorinkubation in Gegenwart von Triton X-100, 4-MU-NeuAc als Substrat
- ▲ Vorinkubation in Gegenwart von Triton X-100, Gangliosid G_{D1a} als Substrat
- Vorinkubation in Gegenwart von Octylglucosid, 4-MU-NeuAc als Substrat
- △ Vorinkubation in Gegenwart von Octylglucosid, Gangliosid G_{D1a} als Substrat

2.3. Einfluß der Lokalisation von Enzym und Substrat auf die sialidase-katalysierte Gangliosidspaltung

Die Fragestellung, die hinter den im Folgenden beschriebenen Experimenten steht, lautet: Wie läuft die der eigentlichen enzymatischen Reaktion vorgeschaltete Begegnung zwischen der membrangebundenen Sialidase und dem lipophilen Gangliosidsubstrat ab, nachdem beide nicht in monomerer Form wasserlöslich sind und somit nicht einfach durch Diffusion innerhalb der wässrigen Phase zueinander gelangen können ? Welchen Gesetzmäßigkeiten gehorcht diese Begegnung und welchen Einfluß haben die Testbedingungen darauf ?

In früheren Abschnitten wurde bereits erwähnt, daß von verschiedenen Arbeitsgruppen recht unterschiedliche Verfahren entwickelt wurden, um den Umsatz von Gangliosiden durch die membrangebundene Sialidase zu bestimmen, die alle ihre Vor- und Nachteile haben. Die natürlichen Verhältnisse werden sicherlich am besten wiedergespiegelt, wenn man den Abbau der in der sialidasehaltigen Membranfraktion gleichermaßen enthaltenen endogenen Substrate beobachtet. Das erfordert jedoch einen sehr großen experimentellen Aufwand: Man muß zuerst in vivo durch Gabe radioaktiver Vorstufen der Neuraminsäure alle Sialoverbindungen radioaktiv markieren, dann die gewünschte Membranfraktion isolieren und schließlich vor und nach erfolgter enzymatischer Reaktion die verschiedenen Sialoverbindungen voneinander trennen und ihre Menge radiometrisch ermitteln (294).

Die andere, wesentlich weniger physiologische Vorgehensweise besteht in einer schonenden Behandlung der Enzympräparation mit einem Überschuß an Detergens, ohne dadurch das Enzym zu denaturieren. Dabei wird der native Membranverband aufgelöst und es entstehen Detergens/Lipid- und Detergens/Protein-Mischmizellen, zwischen denen ein vergleichsweise schneller Substanz austausch erfolgt. In kinetischer Hinsicht verhält sich dann ein solches System analog zu einem wasserlöslichen, jedoch mit den Mischmizellen als eigentlichem Reaktionsraum. Weiss und Wingfield (283) gelang es für zwei andere lipidgebundene Enzym/Substrat-Systeme, die Succinat-Ubichinon-Reduktase und die Ubichinon-Cytochrom-c-Reduktase, die in einer solchen detergenshaltigen Suspension auftretenden Reaktionsgeschwindigkeiten durch ein kinetisches Modell quantitativ zu beschreiben. Die so mögliche exakte Bestimmung enzymkinetischer Parameter muß allerdings wegen der Zerstörung

der natürlichen Membranstruktur mit einem großen Verlust an biologischer Aussagekraft erkaufte werden.

Eine Art Mittelweg wurde mit dem in den vergangenen Abschnitten beschriebenen Sialidasetest eingeschlagen, der bei weitgehend intakter, enzymtragender Membran mit Hilfe zugesetzten radioaktiv markierten Gangliosids eine experimentell einfache Ermittlung der Sialidaseaktivität zuläßt. Der große Nachteil dieses Tests liegt in der Ungewißheit, inwieweit die so gemessenen Abbauraten tatsächlich nur Ausdruck der Enzymaktivität sind, oder ob sie durch die Anwesenheit endogener Substrate und das Vorliegen von Enzym und exogenem Substrat in verschiedenen Aggregaten (Membran und Mizelle) verfälscht werden. Doch liegt gerade darin auch der Vorteil, durch genauere Untersuchungen zu diesen Fragen eventuell tiefere Einsicht in die Mechanismen gewinnen zu können, nach denen die membrangebundene Sialidase mit ihren lipophilen Gangliosidsubstraten in Wechselwirkung tritt.

Im Fall wasserlöslicher bakterieller oder viraler Sialidasen wurde die sehr ausgeprägte Abhängigkeit des Gangliosidumsatzes von der Art der Gangliosidaggregate (Reinmizellen, Mischmizellen mit anderen Gangliosiden und Detergentien, Proteinkomplexe, Mischliposomen) eingehend untersucht (z.B. 27, 272) und verschiedene Möglichkeiten für die Geschwindigkeitsgleichungen solcher Reaktionsabläufe simuliert (64, 276). Für membrangebundene Sialidasen existieren diesbezüglich viel weniger Daten, und die daraus abgeleiteten Schlußfolgerungen und Modellvorstellungen sind z.T. recht unterschiedlich. Tettamanti und Mitarbeiter (256, 258) nehmen an, daß die Sialidase aus Kalbshirn nur Gangliosidmonomere und G_{D1a}/G_{M1} -Mischmizellen als Substrate nutzt, nicht jedoch reine G_{D1a} -Mizellen. Erst nach Zugabe von Detergentien wird dann auch oder sogar nur noch mizellares Gangliosid abgebaut. Diese Interpretationen gehen jedoch von einer kritischen Mizellkonzentration für Gangliosid G_{D1a} von 0.1 mM aus, die sich inzwischen als viel zu hoch angesetzt herausgestellt hat (vgl. Einleitung). Sandhoff und Mitarbeiter (209, 208) dagegen zogen aus ihren Experimenten mit ebenfalls mizellarem Gangliosidsubstrat den Schluß, daß das Gangliosid zuerst an die Membran gebunden wird und dann durch laterale Diffusion in der Membranebene zur Sialidase gelangt.

Über die Substrateigenschaften vesikulärer Gangliosid/Phospholipid-Mischdispersionen gegenüber der membrangebundenen Sialidase sind bisher noch keine Untersuchungen bekannt geworden. Lediglich für den Fall eines anderen, eventuell ähnlich funktionierenden Enzym/Substrat-Systems wurde

festgestellt, daß die membrangebundene Sphingomyelinase nicht nur Sphingomyelin der eigenen Membran abbauen kann, sondern auch solches, das in andere Membranen oder in künstliche Liposomen eingebaut ist (196). Über den Mechanismus dieses "Intermembran-Abbaus" konnten die Autoren noch keine genaueren Angaben machen, doch schien er nicht auf einer Fusion von sphingomyelinase- und sphingomyelinhaltigen Membranen zu beruhen.

Das Fehlen entsprechender Daten für die membrangebundene Sialidase sowie die genannten unterschiedlichen Modellvorstellungen ließen es notwendig erscheinen, etwas mehr Licht in die Eigenheiten der Wechselwirkungen zwischen der Sialidase und dem lipophilen Gangliosidssubstrat zu bringen, insbesondere wenn letzteres den enzymhaltigen Membranen von außen zugesetzt wird. Bevor auf diesen Problemkreis eingegangen wird, soll die verwendete Sialidasepräparation jedoch erst unter Verwendung der beiden anderen Testverfahren - Abbau endogener Ganglioside und Abbau in Gegenwart von Detergens - charakterisiert und in ihren Eigenschaften mit den Angaben in der Literatur verglichen werden.

2.3.1. Abbau endogener Gangliosidsubstrate

Es wurde bereits erwähnt, daß die membrangebundene Sialidase neben endogenen Gangliosiden auch die in der Enzympräparation ebenfalls enthaltenen Sialoglykoproteine abbaut, allerdings langsamer, und daß die Methoden, beides getrennt zu messen, recht aufwendig sind. Ausgehend von den eigenen Erfahrungen bei der Isolierung und Reindarstellung von Gangliosiden wurde daher ein Verfahren entwickelt, das eine direkte Ermittlung des Gangliosidumsatzes erlaubt, ohne den Abbau endogener Sialoglykoproteine zu erfassen (zur genauen Durchführung s. Abschnitt 6.3.5.). Dabei wird die Membranpräparation nach Inkubation unter den gewünschten Bedingungen auf eine kleine Anionenaustauschersäule aufgetragen, wo sie auf Grund ihrer Partikelgröße liegen bleibt. Mit wässriger Ammoniumacetatlösung werden die freigesetzte NeuAc und alle Puffersalze eluiert. Durch einen Wechsel auf organische Elutionsmittel werden dann die Lipide aus der Membranpräparation herausgelöst und wandern durch die Säule. Nur negativ geladene Lipide werden festgehalten und so von den Neutrallipiden abgetrennt. Die Fraktion der geladenen Lipide, die bereits überwiegend aus Gangliosiden besteht, wird anschließend mit Ammoniumacetat in organischer Lösung eluiert

und durch analytische Dünnschichtchromatographie an Kieselgel in ihre Bestandteile aufgetrennt. Nach spezifischem Anfärben der sialsäurehaltigen Glykolipide mit Resorcin-Reagens (247) wird ihre Menge densitometrisch bestimmt. Durch Vergleich mit dem Gangliosidgehalt einer nicht inkubierten Sialidasepräparation bekommt man direkten Aufschluß über den Umsatz der einzelnen Gangliosidspezies. Die im wässrigen Säuleneluat enthaltene freie NeuAc läßt sich zur Gegenkontrolle sowie zum Abschätzen der freigesetzten NeuAc aus anderen endogenen Sialidasesubstraten verwenden. Eine streckenweise ähnliche Prozedur wurde von Ando et. al. (3) beschrieben, jedoch nur zur Bestimmung von Gangliosidgehalten und nicht zur Messung von Sialidaseaktivitäten benutzt.

Die mit der vorgestellten Methode durchgeführten Untersuchungen ergaben, daß die in der vorliegenden Arbeit verwendeten mikrosomalen Membranen aus Kalbshirn je nach Präparation zwischen 30 und 40 nmol gangliosidgebundene NeuAc je mg Protein enthielten. Das entsprach etwa $20 \frac{\text{nmol}}{\text{mg}}$ an Gangliosiden, wovon 20 bis 30 mol-% auf Gangliosid G_{M1} , 50 bis 60 mol-% auf Gangliosid G_{D1a} , 6 bis 8 mol-% auf Gangliosid G_{D1b} und etwa 10 mol-% auf Gangliosid G_{T1b} entfielen. Diese Werte stimmen gut mit den Angaben in der Literatur für gleiche oder ähnliche Hirnpräparationen überein (223, 284, 30, vgl. auch 243).

Abb. 13 a zeigt die originalen Densitometerkurven, wie sie nach verschieden langer Inkubation frisch präparierter Kalbshirnmikrosomen bei 37° C erhalten wurden. Ausgehend vom angegebenen Muster der Hauptganglioside verschwanden mit der Zeit die Polysialoganglioside immer mehr zugunsten des gemeinsamen Endprodukts Monosialogangliosid G_{M1} , das gegen den Angriff der Sialidase resistent ist (vgl. Einleitung). Nach zwanzig Stunden waren die Polysialoganglioside praktisch vollständig abgebaut, und neben dem Gangliosid G_{M1} sind nur noch einige Spurenkomponenten erkennbar, die zum Teil vorher von den großen Peaks der Hauptganglioside verdeckt waren. Das bei weitem häufigste dieser Spurenganglioside (ca. 3 bis 5 mol-% aller Ganglioside) läuft im Dünnschichtchromatogramm unmittelbar hinter Gangliosid G_{D1a} und besteht sehr wahrscheinlich (vgl. 3) aus " G_{D1a} -GalNAc" (gleiche Struktur wie Gangliosid G_{D1a} , jedoch ist an die äußere Galaktose neben NeuAc noch GalNAc in β 1-4-Verknüpfung gebunden), das ebenfalls gegen Sialidasen stabil ist (286).

Die aus Abb. 13 a herausgegriffenen und in Substanzmengen umgerechneten

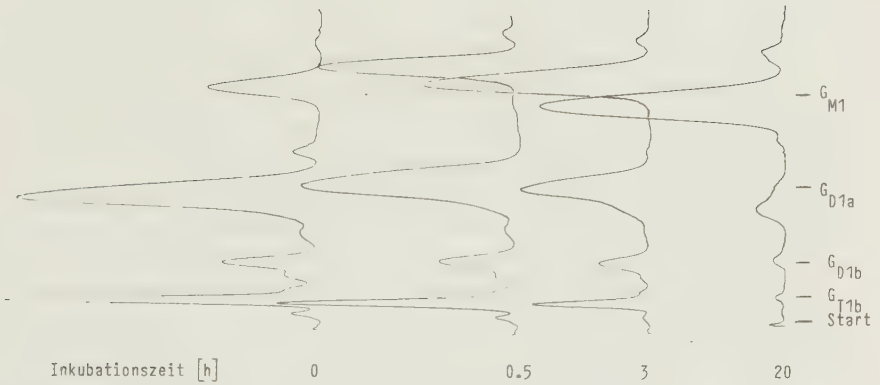


Abb. 13 a

Abbau endogener Gangliosidsubstrate durch die membrangebundene Sialidase

0,5 ml Ansatz enthielten 500 μg mikrosomales Protein (M.G, frisch präpariert) und 50 mM Formiatpuffer pH 3,6 (Endionenstärke: 23 mM). Nach verschieden langer Inkubation bei 37° C wurden aus den mikrosomalen Membranen die Ganglioside isoliert und nach Dünnschichtchromatographie densitometrisch analysiert (s. Abschnitt 6.3.5.). Gezeigt sind die nach verschiedenen Inkubationszeiten erhaltenen Densitometerkurven (Absorption bei 580 nm). Die Flächen unter den Kurven sind den Gangliosidmengen näherungsweise proportional. Nur die Hauptganglioside wurden bezeichnet.

Werte für den Gehalt an Gangliosid G_{D1a} sind in Abb. 13 b gegen die Inkubationszeit aufgetragen. Die zu Beginn vorhandenen 12 nmol Gangliosid G_{D1a} pro mg mikrosomalem Protein wurden von der membrangebundenen Sialidase mit einer Anfangsgeschwindigkeit von ca. $7 \frac{\text{nmol}}{\text{h} \cdot \text{mg}}$ gespalten, ehe dann durch Abnahme der Substratmenge und eventuell auch durch Inaktivierung des Enzyms (vgl. Abschnitt 2.2.3.) die Umsatzraten mehr und mehr absanken. Soweit vergleichbar stimmen die erhaltenen Ergebnisse zum Abbau endogener Ganglioside - zumindest qualitativ - ausgezeichnet mit denen anderer Arbeitsgruppen (z.B. 79, 171, 294) überein und zeigen, daß die Umsatzgeschwindigkeiten für das in der Sialidasepräparation bereits enthaltene Gangliosid G_{D1a}

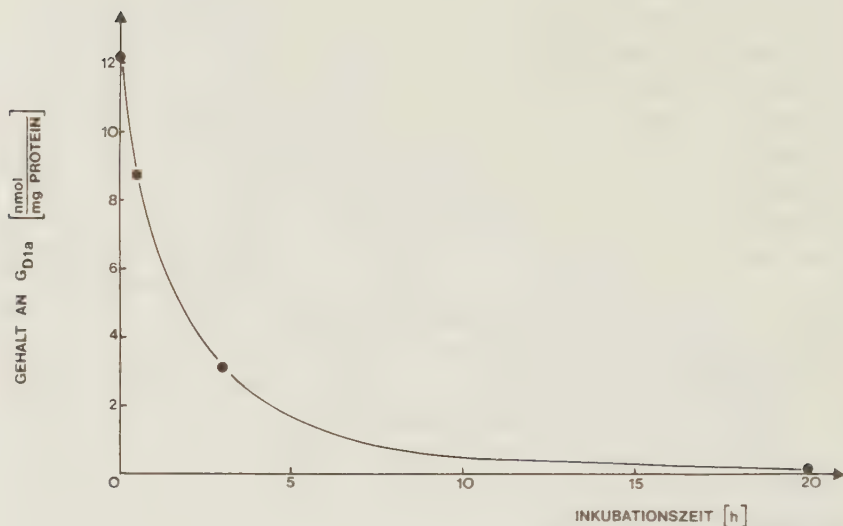


Abb. 13 b

Zeitabhängigkeit des Abbaus endogenen Gangliosids G_{D1a} durch die membrangebundene Sialidase
 Aus den Chromatogrammen von Abb. 13 a wurde anhand von Eichkurven der endogene Gangliosid- G_{D1a} -
 Gehalt ermittelt und gegen die Inkubationszeit aufgetragen.

von der gleichen Größenordnung sind wie für zugesetztes, radioaktiv markiertes Gangliosid (s. z.B. Abb. 9 a).

In den folgenden Kapiteln wird noch gelegentlich auf den Abbau endogener Ganglioside durch die membrangebundene Sialidase zurückgegriffen werden, wenn es darum geht, unter möglichst natürlichen Bedingungen die physiologische Relevanz von Befunden zu untermauern, die mit anderen Verfahren zur Bestimmung der Sialidaseaktivität gewonnen wurden. Ansonsten fand in der Regel tritiummarkiertes Gangliosid G_{D1a} als Substrat Verwendung, da sich dessen Abbau wesentlich einfacher, schneller, genauer und empfindlicher messen läßt (vgl. Abschnitt 2.1.2.3.). Der Einfluß einer dabei möglicherweise auftretenden Veränderung der Umsatzgeschwindigkeiten durch eine behinderte Enzym-Substrat-Wechselwirkung sollte sich, wie zu Beginn des Kapitels bereits dargelegt, durch den Einsatz von Detergentien weitgehend ausschalten lassen.

2.3.2. Abbau exogenen Gangliosids G_{D1a} in Gegenwart von Detergens

Wie schon erwähnt, soll der Detergenszusatz dazu dienen, die sialidasehaltigen Membranen in Mizellare Detergens/Lipid/Protein-Mischaggregate zu verwandeln, um für Enzym und Substrat einen einheitlichen Reaktionsraum zu schaffen, in dem keine Diffusionsbarrieren, sondern nur enzymkinetische Parameter geschwindigkeitsbestimmend für den Gangliosidumsatz sind. Das zu diesem Zweck eingesetzte Detergens sollte die Sialidase natürlich möglichst wenig schädigen, so daß dafür nach Abschnitt 2.2.5. vor allem Triton X-100 in Frage kam. Ein Vergleich der in früheren Abschnitten bereits gezeigten Daten zur Sialidaseaktivität in Abwesenheit und Gegenwart von Triton (vgl. z.B. Abb. 3 mit Abb. 9 a) macht deutlich, daß unter den üblichen Ansatzbedingungen (0.1 ml Ansatzvolumen, 0.1 mg mikrosomales Protein, 0.1 mM Gangliosid G_{D1a} , pH 3.6, 37° C) der Gangliosidumsatz durch Triton um ein Mehrfaches auf Werte zwischen 40 und 60 $\frac{\text{nmol}}{\text{h} \cdot \text{mg}}$ gesteigert wird, ganz in Übereinstimmung mit früheren Arbeiten (z.B. 208, vgl. Einleitung).

Im Unterschied zum Abbau endogenen Gangliosids lassen sich beim Sialidasetest mit exogenem Substrat nun ohne weiteres die dem Enzym zur Verfügung stehenden Gangliosidmengen variieren und aus den so erhaltenen Substratabhängigkeiten die enzymkinetischen Parameter K_M (Michaelis-Konstante) und $V_{\max}$ (maximale Umsatzgeschwindigkeit) berechnen (zur Methodik s. Abschnitt 6.3.6.). Mehrfach durchgeführte Bestimmungen mit verschiedenen Mikrosomenpräparationen lieferten für K_M Werte zwischen 0.04 und 0.05 mM und für $V_{\max}$ zwischen 95 und 100 $\frac{\text{nmol}}{\text{h} \cdot \text{mg}}$ (s. z.B. die in anderem Zusammenhang gezeigte Substratabhängigkeit in Abb. 28, Abschnitt 2.5.1.). Diese Parameter sind jedoch keine wahren Enzymkonstanten, sondern nur scheinbare, da sie mehrfachen, nicht ohne weiteres vermeidbaren Verfälschungen unterliegen (keine echten Anfangsgeschwindigkeiten, endogene Substrate, vgl. Abschnitt 6.3.6.). Literaturangaben (186, 223) zu den kinetischen Konstanten der membrangebundenen Sialidase aus Kalbshirn liegen, soweit sie unter einigermaßen vergleichbaren Testbedingungen erhalten wurden, im gleichen Bereich (K_M : 0.02 mM bzw. 0.08 mM, $V_{\max}$: 90 $\frac{\text{nmol}}{\text{h} \cdot \text{mg}}$).

Wie und warum ändern sich aber nun die kinetischen Verhältnisse, wenn die vermittelnde Wirkung des Detergens wegfällt?

2.3.3. Abbau exogenen Gangliosids G_{D1a}

Im vorhergehenden Abschnitt wurde schon festgestellt, daß in Abwesenheit von Detergens das zugesetzte Gangliosid G_{D1a} unter den üblichen Ansatzbedingungen deutlich langsamer abgebaut wird. Bei einer Gangliosidkonzentration von 0.1 mM im Ansatz betrugen die Umsatzraten bei einer Ionenstärke von 150 mM nur mehr zwischen 10 und $20 \frac{\text{nmol}}{\text{h} \cdot \text{mg}}$, bei der niedrigen Ionenstärke von 23 mM immerhin noch zwischen 20 und $40 \frac{\text{nmol}}{\text{h} \cdot \text{mg}}$. Auf die Ursachen dieses Ionenstärkeinflusses wird später noch näher eingegangen (Abschnitt 2.4.3. und 4.1.).

Die Ermittlung enzymkinetischer Parameter stieß ohne Detergenszusatz auf beträchtliche Schwierigkeiten. Im Unterschied zu Abb. 5 (Abschnitt 2.1.3.) nahm der Gangliosidabbau nun nicht mehr linear mit der Zeit zu, sondern flachte bereits unter einer Stunde merklich ab (vgl. Abschnitt 4.1.). Besonders ausgeprägt war dies bei physiologischer Ionenstärke, da hier nach längerer Inkubation auch eine Inaktivierung der Sialidase spürbar wurde (s. Abschnitt 2.2.3.). Die zur Ermittlung kinetischer Konstanten gemessenen Abhängigkeiten des Gangliosidumsatzes von der Substratkonzentration zeigten oberhalb von 0.1 bis 0.2 mM Gangliosid eine - aus der Literatur (186, 223, vgl. auch 215) ebenfalls bekannte - Substrathemmung, d.h. ein weiterer Gangliosidzusatz bewirkte keine Steigerung des Umsatzes mehr, sondern im Gegenteil eine Verlangsamung. Die kinetischen Parameter für die sialidasekatalysierte Gangliosidspaltung konnten daher in Abwesenheit von Detergens nur mit einer viel geringeren Zuverlässigkeit berechnet werden und differierten je nach Rechenmethode (vgl. Abschnitt 6.3.6.) z.T. erheblich. Bei physiologischer Ionenstärke von 150 mM lagen die Werte für K_M etwa zwischen 0.15 und 0.21 mM und für $V_{\max}$ etwa zwischen 47 und $57 \frac{\text{nmol}}{\text{h} \cdot \text{mg}}$, bei der niedrigen Ionenstärke von 23 mM etwa zwischen 0.09 und 0.15 mM bzw. zwischen 80 und $100 \frac{\text{nmol}}{\text{h} \cdot \text{mg}}$.

An dieser Stelle erscheint ein direkter Vergleich der Abbauraten für endogenes und exogenes Gangliosid G_{D1a} , ohne und mit Triton, interessant. Zu diesem Zweck wurden aus den Substratabhängigkeiten mit exogenem Gangliosid diejenigen Werte ausgewählt, die der im Fall des endogenen Gangliosids ja vorgegebenen Substratmenge von etwa 12 nmol je mg mikrosomalem Protein (s. Abb. 13 b) entsprachen. Tab. 3 läßt erkennen, daß in Abwesenheit von

Detergens exogenes Gangliosid G_{D1a} etwas langsamer gespalten wurde als endogenes. Stellt man in Rechnung, daß es mit einer gleich großen Menge an endogenem Substrat konkurrieren muß, so zeigt dies eine recht ähnliche Affinität der membrangebundenen Sialidase zu beiden Substrattypen. Triton im Ansatz dagegen steigert den Abbau zugesetzten Gangliosids auf ein Mehrfaches, weit über den Wert für endogenes Gangliosid hinaus. Da eine solche Stimulierung für die Spaltung wasserlöslicher Sialidasesubstrate nicht beobachtet werden konnte (vgl. z.B. den Umsatz von 4-MU-NeuAc in Abb. 11 bei Abwesenheit von Protease mit demjenigen in Abb. 12 a bei unterbliebener Vorinkubation), scheint sie weniger an die Eigenschaften der Sialidase selbst als vielmehr an die Eigenschaften des Substrats gekoppelt zu sein. Das unterstreicht nochmals die Bedeutung, die der eingangs zu diesem Kapitel dargelegten Art und Weise der Begegnung zwischen membrangebundener Sialidase und lipophilem Gangliosidsubstrat zukommt. Möglicherweise am stärksten sollte diese Begegnung behindert sein, wenn das zugesetzte Gangliosid seinerseits ebenfalls fest in einer Lipiddoppelschicht verankert ist.

Tab. 3

Vergleich der Geschwindigkeiten für den sialidasekatalysierten Umsatz endogenen und exogenen Gangliosids G_{D1a}

Ansätze mit exogenem Gangliosid G_{D1a} enthielten in 0.1 ml Endvolumen 1 nmol [3H]-Gangliosid G_{D1a} und 0.1 mg mikrosomales Protein. Ansätze mit endogenem Substrat enthielten 12 nmol Gangliosid G_{D1a} je mg mikrosomalem Protein (s. Abb. 13 b). Inkubiert wurde bei 37° C in Gegenwart von 50 mM Formiatpuffer pH 3.6 (Endionenstärke: 23 mM). Der Abbau exogenen Substrats wurde radiometrisch bestimmt (s. Abschnitt 6.3.3.), zum Abbau endogenen Substrats s. Abschnitt 2.3.1.

	Umsatzrate in $\frac{\text{nmol}}{\text{h} \cdot \text{mg}}$
Endogenes Gangliosid G_{D1a}	7
Exogenes Gangliosid G_{D1a}	4
Exogenes Gangliosid G_{D1a} , 0.2% Triton X-100	17

2.3.4. Abbau exogenen, lipidmembrangebundenen Gangliosids G_{D1a}

Die bisherigen Versuche hatten ergeben, daß die membrangebundene Sialidase sowohl Ganglioside der eigenen Membran als auch Ganglioside, die den Membranen von außen in mizellarer Form zugesetzt wurden, abbauen kann. Trifft das immer noch zu, wenn das zugesetzte Gangliosid selbst auch Bestandteil von Membranen ist, sich also enzym- und substrathaltige Membranen getrennt gegenüberstehen ? Um dieser Frage nachzugehen, wurden durch Ultraschallbehandlung einschalige Lipidvesikel (vgl. 27,7,259,272) aus 65 mol-% Eilecithin, 25 mol-% Cholesterin und 10 mol-% [³H]-Gangliosid G_{D1a} präpariert und der membrangebundenen Sialidase als Substrat angeboten. Wie aus Tab. 4 abzulesen, konnte die Sialidase das Gangliosid auch in dieser Form spalten, allerdings mit einer um etwa 40 % niedrigeren Geschwindigkeit als mizellares Gangliosid unter sonst gleichen Bedingungen.

Auf welche Weise erfolgte nun aber die Spaltung ? Griff die membrangebundene Sialidase über den wässrigen Zwischenraum hinweg das Gangliosid benachbarter Membranen an ("Intermembran-Abbau"), wie das für die Sphingomyelinspaltung durch die membrangebundene Sphingomyelinase postuliert worden war (196), oder mußten die gangliosidhaltigen Vesikel zuerst mit den sialidasehaltigen mikrosomalen Membranen fusionieren, um Substrat und Enzym zueinander gelangen zu lassen ?

Hinweise auf einen der beiden Mechanismen konnten möglicherweise durch Inkubationsbedingungen erbracht werden, von denen zu erwarten war, daß sie die Enzym-Substrat-Wechselwirkung je nach Mechanismus unterschiedlich beeinflussen sollten. Zum einen war bekannt, daß höherer Druck an Lachgas (N₂O) den Umsatz zugesetzten Gangliosids G_{D1a} erheblich stimulierte, bei gleichzeitiger leichter Hemmung der Sialidaseaktivität gegenüber dem wasserlöslichen Substrat [³H]-Sialyllactit (208), und außerdem die Viskosität mikrosomaler Membranen herabsetzte (214), ohne wie ein Detergens den Membranverband zu zerstören. Zum anderen war in unserem Arbeitskreis ein Aktivatorprotein für den Abbau des Gangliosids G_{M2} durch die lysomale Hexosaminidase A charakterisiert worden, das unter anderem auch den Transfer von Gangliosid G_{D1a} zwischen Lipidvesikeln katalysieren konnte (34). Wie Tab. 4 zeigt, steigerten beide Agentien sowohl den Abbau mizellaren als auch vor allem vesikelgebundenen Gangliosids G_{D1a} und führten bei gleichzeitiger Anwesenheit durch Addition der Effekte zu praktisch gleich schnellem Umsatz beider Substratformen.

Tab. 4

Abbau mizellaren und lipidmembrangebundenen Gangliosids G_{D1a} durch die membrangebundene Sialidase unter verschiedenen Bedingungen

0.1 ml Ansatz enthielten 100 μ g mikrosomales Protein (M.E), 10 nmol [3H]-Gangliosid G_{D1a} in reiner, mizellarer Form bzw. eingebaut in Lipidvesikel (65 mol-% Eilecithin, 25 mol-% Cholesterin, 10 mol-% Gangliosid G_{D1a} ; zur Darstellung s. Abschnitt 6.3.4.), 50 mM Formiatpuffer pH 4.0 und NaCl entsprechend einer Ionenstärke von 150 mM. Gegebenenfalls enthielten die Ansätze außerdem noch 5 Einheiten Aktivatorprotein (Geschenk von J. Burg), entsprechend einer Transportkapazität von ca. 0.35 nmol Gangliosid G_{D1a} pro Minute (34). Nach einstündiger Inkubation, gegebenenfalls im Autoklaven (207) unter einem Lachgasdruck von 30 atm, wurde der Gangliosidumsatz radiometrisch ermittelt (s. Abschnitt 6.3.3.). Angegeben sind die Umsatzraten in $\frac{nmol}{h \cdot mg}$, entweder als Einzelwerte oder als Mittelwerte zweier Bestimmungen unter Angabe der Standardabweichungen.

Besondere Bedingungen	Enzymatisch freigesetztes Gangliosid G_{M1} aus mizellarem Gangliosid G_{D1a}	Gangliosid- G_{D1a} -haltigen Lipidvesikeln
-	15.6 $\pm$ 0.2	9.4 $\pm$ 0.4
30 atm Lachgas	39.5 $\pm$ 2.3	29.9
5 Einheiten Aktivator	21.2 $\pm$ 0.9	14.6
30 atm Lachgas und 5 Einheiten Aktivator	50.0 $\pm$ 0.1	48.7

Diese Resultate schließen einen "Intermembran"-Mechanismus so gut wie aus, da er die beobachteten, starken Stimulierungen des Gangliosidumsatzes nicht erklären würde. Allenfalls könnte Lachgas durch seine fluidisierende Wirkung auf Membranen den ansonsten sehr langsamen Gangliosidaustausch zwischen der Innen- und Außenseite der Vesikelmembran (233, 27, 272, vgl. auch 60, Ü 266) beschleunigen und über das größere Substratangebot die Abbauraten erhöhen, allerdings maximal um 40 bis 50 %, entsprechend dem Gangliosidanteil auf der Vesikelinnenseite (vgl. z.B. 272), und nicht um den Faktor drei. Die Wirkung des wasserlöslichen Aktivatorproteins müßte sogar völlig unverständlich bleiben.

Spaltet die membrangebundene Sialidase dagegen nur Gangliosid, das in die eigene Membran eingebaut ist, so muß der enzymatischen Reaktion entweder

eine Fusion der mikrosomalen Membranen mit den gangliosidhaltigen Vesikeln oder ein Gangliosidtransfer von den Vesikeln zu den mikrosomalen Membranen vorgeschaltet sein. Negativ geladene Lipide ermöglichen Membranfusionen (176, 146, 151) und so erscheint eine Fusion der mit zweifach negativ geladenem Gangliosid G_{D1a} beladenen Lipidvesikel mit den obendrein proteinhaltigen mikrosomalen Membranen sehr plausibel. Die unter Lachgas herabgesetzte Membranviskosität erleichterte die Fusion und/oder das Zueinanderkommen von Enzym und Substrat innerhalb der fusionierten Membranen und verursachte so die beobachtete Umsatzsteigerung. Unabhängig davon katalysierte das Aktivatorprotein den Gangliosidaustausch zwischen enzym- und substrathaltigen Membranen und erhöhte ebenfalls das Substratangebot. Beides zusammen bewirkte, daß das vesikelgebundene Gangliosid G_{D1a} der Sialidase genauso schnell zur Verfügung stand wie das mizellare und somit gleich schnell abgebaut wurde.

All das spricht für einen Gangliosidabbau nur innerhalb der sialidasehaltigen Membran, doch ist ein Mischmechanismus nicht ganz auszuschließen, bei dem in vergleichsweise geringem Umfang oder mit vergleichsweise geringer Geschwindigkeit auch Gangliosid benachbarter Lipidaggregate angegriffen wird. Einer solchen Möglichkeit wird im folgenden Abschnitt weiter nachgegangen.

2.3.5. Untersuchungen zur eigentlich abbaubaren Form exogenen Gangliosids G_{D1a}

Im vorhergehenden Abschnitt hatte sich besonders pointiert die Frage gestellt, in welcher Form das den mikrosomalen Membranen zugesetzte, lipidmembrangebundene Gangliosid G_{D1a} von der Sialidase als eigentliches Substrat erkannt wird, und war dort zugunsten eines zumindest stark bevorzugten Abbaus des Gangliosids innerhalb der sialidasehaltigen Membran entschieden worden. Stillschweigend war das gleiche auch für in mizellarer Form angebotenes Gangliosid angenommen worden, als der Umsatz beider Formen miteinander verglichen wurde. Ein sialidasekatalysierter Abbau von Gangliosid aus benachbarten Lipidaggregaten läßt sich jedoch nur dann mit einiger Sicherheit völlig ausschließen, wenn man nach kurzer Inkubation die gangliosidhaltigen Aggregate wieder von den mikrosomalen Membranen abtrennen (falls und soweit sie sich noch nicht mit diesen fest verbunden haben) und in ihnen kein Abbauprodukt Gangliosid G_{M1} nachweisen kann. Diesbezügliche Studien mit mizellarem Gangliosidsubstrat sind Gegenstand des folgenden Abschnitts.

2.3.5.1. Rückschlüsse aus der Lokalisation des Abbauprodukts Gangliosid G_{M1}

Aus früheren Arbeiten unseres Arbeitskreises war bereits bekannt, daß mizellares Gangliosid an mikrosomale Membranen bindet und nach Abzentrifugieren der Membranen zu mehr als 95 % im Pellet erscheint (209, 208). Ein Großteil des gebundenen Gangliosids ließ sich jedoch durch Waschen mit Puffern physiologischer Ionenstärke oder durch Inkubation in Gegenwart von Trypsin wieder von den Membranen ablösen (175). Ein ganz ähnliches Verhalten zeigten Ganglioside bei der Bindung an Membranen lebender Zellen (21, 191). Es erschien daher sinnvoll, folgenden Versuchsaufbau zu wählen (zur genauen Durchführung s. Abschnitt 6.4.1.): Mikrosomale Membranen wurden zusammen mit mizellarem [³H]-Gangliosid G_{D1a} bei dem für die Sialidase optimalen pH-Wert von 3.6 bei 37° C inkubiert. Anschließend wurde jeder Ansatz neutralisiert und je ein Aliquot daraus entweder sofort oder erst nach Inkubation in Gegenwart von Trypsin bei 100 000 g zentrifugiert. Für beide Aliquots wurde jeweils der Gehalt an Gangliosid G_{D1a} und G_{M1} in den freien Gangliosidmizellen des Überstands und in den mikrosomalen Membranen des Pellets ermittelt.

In Tab. 5 sind für eines dieser Experimente die Ergebnisse nach verschiedenen Inkubationszeiten aufgeführt. Aus den Werten für die nicht inkubierten Kontrollen (diese Aliquots wurden dem Hauptansatz noch vor der Inkubation bei 37° C entnommen) geht hervor, daß auch nach Trypsinbehandlung weder in den Mizellen noch in den mikrosomalen Membranen nennenswerte Mengen an Gangliosid G_{M1} auftauchten, die über die Verunreinigung des eingesetzten radioaktiven Gangliosids G_{D1a} und die testbedingten Fehler hinausgingen (auch für Kontrollansätze mit hitzeinaktivierten mikrosomalen Membranen liegen die Blindwerte für den Abbau zwischen 0.5 und 1 % des eingesetzten Gangliosids). Es waren jedoch bereits ohne Inkubation mehr als 10 % des angebotenen Gangliosids so fest an die mikrosomalen Membranen gebunden, daß sie sich nicht mehr ablösen ließen. Für diesen Anteil gibt es mehrere Erklärungsmöglichkeiten: Er könnte sich bereits beim Zusammennischen des Ansatzes auf Eis oder aber während der halbstündigen Trypsinbehandlung bei 37° C fest mit den Membranen verbunden haben. Zum dritten könnte er auch an Oberflächenstrukturen der mikrosomalen Membranen adsorbiert gewesen sein, die gegenüber Trypsin stabil sind (vgl. z.B. die große Stabilität der membrangebundenen Sialidase gegen proteolytischen Angriff, Abschnitt 2.2.4.).

Tab. 5

Gehalt an Gangliosid G_{D1a} und G_{M1} in freien Gangliosidmizellen und mikrosomalen Membranen nach Inkubation von mizellarem Gangliosid G_{D1a} mit membrangebundener Sialidase

1.1 ml Ansatz enthielten 1.1 mg mikrosomales Protein (M.F), 0.1 mM $[^3H]$ -Gangliosid G_{D1a} , 50 mM Formiatpuffer pH 3.6 und NaCl entsprechend einer Endionenstärke von 150 mM. Nach verschieden langer Inkubation bei 37° C wurden dem Ansatz jeweils zwei Aliquots zu 100 µl entnommen und neutralisiert. Das eine Aliquot wurde sofort, das andere erst nach halbstündiger Inkubation bei 37° C in Gegenwart von 0.25 % Trypsin, durch Ultrazentrifugation in einen Überstand (freie Gangliosidmizellen) und ein mikrosomales Pellet aufgetrennt. Der Gehalt beider Fraktionen an Gangliosid G_{D1a} und G_{M1} ist in nmol angegeben (zur genauen Durchführung s. Abschnitt 6.4.1.).

		Nicht inkubiert		15 min inkubiert		60 min inkubiert	
		ohne	mit	ohne	mit	ohne	mit
		Trypsinbehandlung		Trypsinbehandlung		Trypsinbehandlung	
G_{M1} in	Mizellen	0.04	0.07	0.03	0.07	0.04	0.05
	Mikrosomen	0.05	0.02	0.55	0.51	1.65	1.64
G_{D1a} in	Mizellen	5.20	8.73	2.75	5.53	1.81	3.23
	Mikrosomen	4.72	1.18	6.67	3.88	6.50	5.08

Mit der Inkubation des Hauptansatzes bei 37° C nahm dann der mikrosomale Gangliosidanteil rasch zu, und nach einer Stunde war selbst nach Trypsinie- rung nur mehr ein Drittel des Gangliosids in freier, mizellarer Form wieder- zufinden. Der wichtigste Befund aber war, daß sich das während der Inkubation enzymatisch gebildete Gangliosid G_{M1} nur in den mikrosomalen Membranen, nicht aber in freien Gangliosidmizellen nachweisen ließ. Sogar das mittels proteo- lytischer Behandlung der mikrosomalen Membranen ablösbare Gangliosid be- stand nur aus G_{D1a} . Daraus folgt eindeutig, daß die membrangebundene Siali- dase mizellares Gangliosid G_{D1a} nicht als Substrat erkennt, im Sinne eines Abbaus unter Belassung im Mizellverband. Die Sialidase könnte allerdings gleichzeitig wie ein Lipidtransferprotein wirken, d.h., einer Mizelle Gangliosid G_{D1a} entnehmen, es spalten und das entstandene Gangliosid G_{M1} in die eigene Membran überführen. Wäre dies der einzige Einbauweg, so sollte man aber nur Gangliosid G_{M1} in den mikrosomalen Membranen finden, nicht aber mit zunehmender Inkubationszeit auch immer mehr Gangliosid G_{D1a} . Ein Abbau freier, mit den Mizellen im Gleichgewicht stehender Gangliosidmonomerer erscheint wegen deren äußerst niedriger Konzentration auf Grund der heute

allgemein akzeptierten sehr kleinen kritischen Mizellkonzentration von Gangliosiden (vgl. Einleitung) als sehr unwahrscheinlich. Außerdem sollten sich die dann freigesetzten Gangliosid- G_{M1} -Monomeren bei obigem Versuch ja ebenfalls im Überstand und nicht nur im Membranpellet nachweisen lassen. Als plausibelster Mechanismus bleibt daher nur übrig, daß sich mizellares Gangliosid G_{D1a} unabhängig von der Sialidase in die mikrosomalen Membranen einbaut und erst dann dem Enzym als Substrat dient.

Was bedeutet aber in diesem Zusammenhang das Wort "einbauen" ? Heißt es, daß das Gangliosid den gleichen Status annimmt wie alle anderen, bereits von Natur aus in den mikrosomalen Membranen vorhandenen Lipide, entsprechend etwa der schematischen Darstellung in Abb. 1 (s. Einleitung), oder aber, daß es - lediglich besonders fest gebunden - nach wie vor in mizellaren Aggregaten vorliegt, die ja kinetisch sehr stabil sein sollen (57) ? Mehr Aufschluß über den Aggregationszustand des exogenen, aber fest mit der mikrosomalen Membran assoziierten Gangliosids sollte mit Hilfe physikalisch-chemischer Methoden gewonnen werden.

2.3.5.2. Rückschlüsse aus der Wechselwirkung eines spinmarkierten Gangliosid-analogons mit mikrosomalen Membranen

Wie schon erwähnt war es bereits seit längerem bekannt, daß exogene Ganglioside an natürliche Membranen binden, doch war bisher nie ein eindeutiger physikalisch-chemischer Beweis erbracht worden, daß sie sich dabei auch tatsächlich in den Verband der Membranlipide eingliedern. Von vielen Autoren wurde das lediglich stillschweigend angenommen oder aus der biologischen Wirksamkeit der gebundenen Ganglioside indirekt geschlossen (z.B. 15, 25, 105, vgl. auch 55). Auch der beobachtete Einbau mizellaren Gangliosids in künstliche Lipidvesikel (z.B. 26, 259, 55, 287), wo allein schon auf Grund des fehlenden Proteins eine bloße Adsorption der geladenen Gangliosidmizellen recht unwahrscheinlich wird, gab Hinweise auf einen echten Gangliosideinbau auch in zelluläre Membranen. Aber erst in jüngster Zeit war für ein anderes Sphingolipid, das Sphingomyelin, von unserem Arbeitskreis in Zusammenarbeit mit D. Marsh (181, 150) mit Hilfe der Elektronenspinresonanz (ESR)-Technik der Beweis erbracht worden, daß es in synaptische Plasmamembranen wirklich aufgenommen wird. Sphingomyelin gehört allerdings nicht zu den mizellbildenden Lipiden, und so war zur Erzielung eines schnellen Einbaus eine Behandlung mit Ultraschall notwendig. Der

Nachweis des Einbaus fußt auf der besonderen Eigenschaft spinmarkierter Verbindungen, daß mit zunehmender Konzentration und damit abnehmendem gegenseitigem Abstand die spinmarkierten Gruppen miteinander in Wechselwirkung treten, was zu einer charakteristischen Veränderung des ESR-Spektrums führt. Suspended man ein spinmarkiertes Lipid in Wasser, so bildet es Aggregate, in denen maximale Spin-Spin-Austauschwechselwirkungen möglich sind, die auch durch Adsorption der Aggregate an andere Membranen nicht verändert werden. Baut sich das markierte Lipid jedoch unter Auflösung der Aggregate in andere Membranen ein, so wird es mit den dort vorhandenen, unmarkierten Membranlipiden verdünnt und die Spin-Spin-Wechselwirkungen nehmen ab oder verschwinden ganz. Um nun anhand dieser Methode die Art der Assoziation von mizellarem Gangliosid G_{D1a} mit mikrosomalen Membranen zu untersuchen, wurde in Zusammenarbeit mit G. Schwarzmann (vgl. 163, 227) erstmals eine spin- und $[^3H]$ -markierte, diesem Gangliosid analoge Verbindung, $[^3H]$ -Doxyl- " G_{D1a} " synthetisiert, deren Struktur Abb. 14 zeigt:

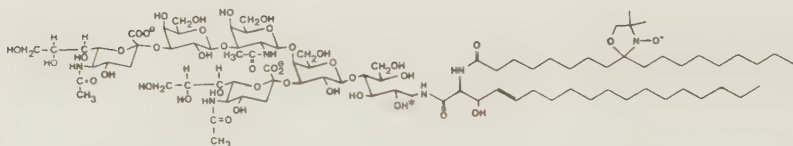


Abb. 14

Struktur der dem Gangliosid G_{D1a} analogen tritium- und spinmarkierten Verbindung $[^3H]$ -Doxyl- " G_{D1a} "

Die Stelle der Tritiummarkierung ist mit einem * bezeichnet.

Die Synthese eines im hydrophoben Molekülteil markierten, ansonsten aber unveränderten Gangliosids erschien damals noch nicht möglich und ist inzwischen auch nur für Gangliosid G_{M3} durchgeführt worden (Schwarzmann, persönliche Mitteilung). Das reine $[^3H]$ -Doxyl-" G_{D1a} " in wässriger Lösung erzeugte im ESR-Spektrum ausschließlich das für Spin-Spin-Wechselwirkungen typische breite Signal (Abb. 15 a), wie auf Grund der Mizellbildung auch nicht anders zu erwarten war. Gemischt mit unmarkiertem Gangliosid G_{D1a} oder eingebaut in Lipidvesikel dagegen erhielt man das davon sehr verschiedene sogenannte Anisotropiespektrum (Abb. 15 b und c). Seine Form ist charakteristisch für ein spinmarkiertes Lipid, das Bestandteil von Lipidaggregaten ist, in denen es sich nicht in allen Raumrichtungen gleichermaßen frei bewegen kann (anisotrope Umgebung).

Inkubiert man nun reine $[^3H]$ -Doxyl-" G_{D1a} "-Mizellen zusammen mit mikrosomalen Membranen, so sollte das Wechselwirkungsspektrum unverändert erhalten bleiben, wenn die Mizellen lediglich an die Membranoberfläche adsorbiert werden. Im Fall einer zunehmenden echten Insertion des Gangliosid-analogons in die mikrosomale Membran jedoch sollte es mit der Zeit immer mehr in ein Anisotropiespektrum übergehen. Die Inkubationsbedingungen wurden ähnlich wie in Tab. 5 (s. vorhergehenden Abschnitt) gewählt, doch enthielt der Ansatz von 0.2 ml 0.5 mg mikrosomales Protein und nur 0.05 mM $[^3H]$ -Doxyl-" G_{D1a} ", um bei Insertion eine ausreichende Verdünnung des spinmarkierten Gangliosidanalogons mit mikrosomalen Lipiden sicherzustellen (zur genauen Durchführung s. Abschnitt 6.4.2.). Das nach fünfzehnminütiger Inkubation bei 37° C aufgenommene ESR-Spektrum ließ mit bloßem Auge nur das Anisotropiesignal erkennen und eine Spektrensubtraktion am Computer ergab einen Anteil noch verbliebener $[^3H]$ -Doxyl-" G_{D1a} "-Mizellen zwischen 0 und maximal 15 %. Eine parallel dazu durchgeführte Messung des Radioaktivitätsgehalts nach der im vorangehenden Abschnitt beschriebenen Methode bestätigte dieses Ergebnis mit einem fest an die Mikrosomen gebundenen Radioaktivitätsanteil von 95 bis 96 %. Eine halbstündige Behandlung der Ansätze mit Trypsin veränderte erwartungsgemäß diese Werte nicht.

Auch bei neutralem pH-Wert, bei dem $[^3H]$ -Gangliosid G_{D1a} nicht oder nur langsam mit mikrosomalen Membranen assoziierte, wurde $[^3H]$ -Doxyl-" G_{D1a} " sehr schnell in die mikrosomalen Membranen inseriert. Bereits ohne Inkubation bei 37° C, allein infolge der Handhabung der Probe bis zur Messung, lagen gemäß Computerauswertung des bei 10° C aufgenommenen ESR-Spektrums

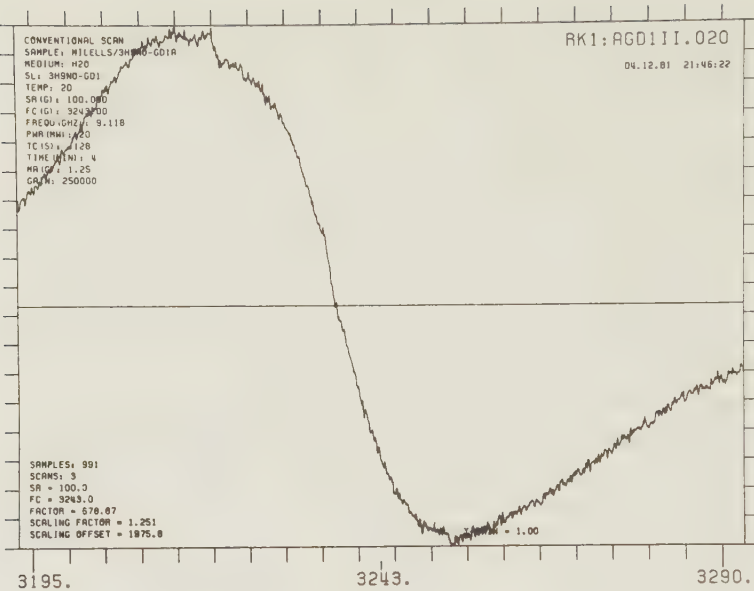


Abb. 15 a

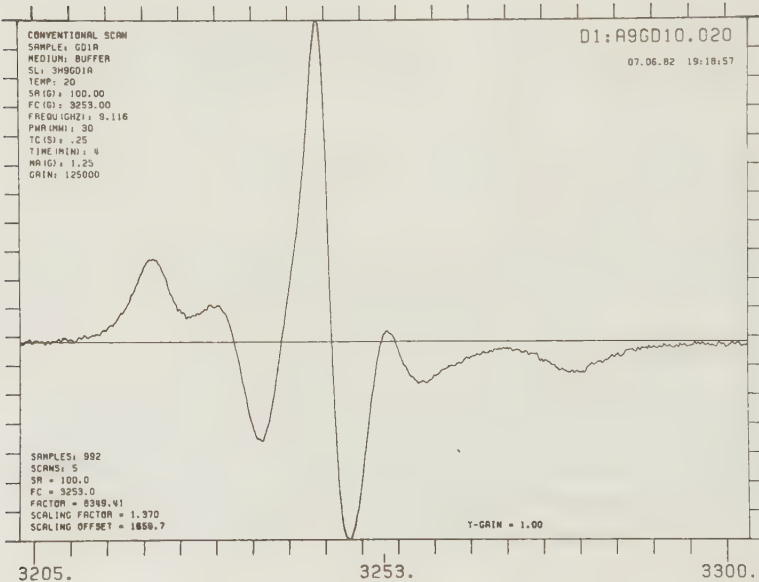


Abb. 15 b

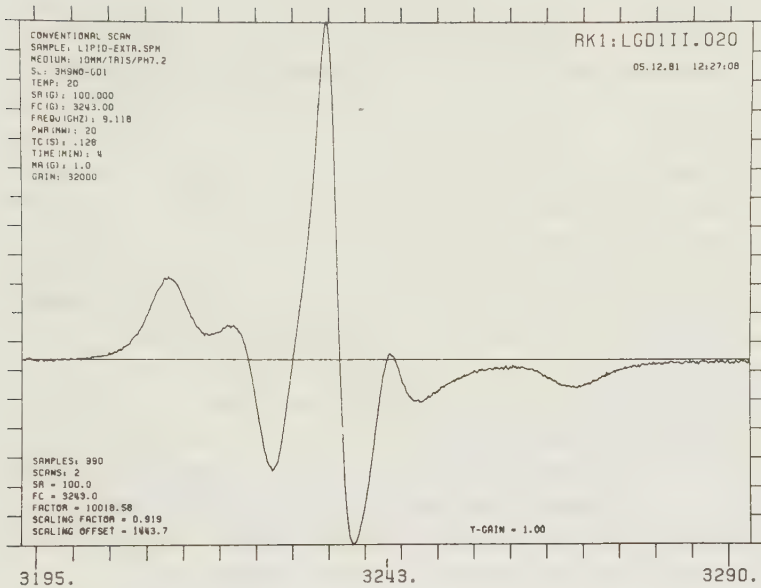


Abb. 15 c

Abb. 15

ESR-Spektren des Gangliosidanalogs $[^3\text{H}]\text{-Doxyl-}^{\text{G}}_{\text{D1a}}$ in verschiedenen Lipidumgebungen
 Alle Spektren wurden bei 20° C aufgenommen (s. Abschnitt 6.4.2.).

- Reines, mizellares $[^3\text{H}]\text{-Doxyl-}^{\text{G}}_{\text{D1a}}$
- Mischmizellen aus Gangliosid G_{D1a} und 1.1 mol-% $[^3\text{H}]\text{-Doxyl-}^{\text{G}}_{\text{D1a}}$
 Die Probekapillare enthielt in 32 μl Wasser 177 nmol Gangliosid G_{D1a} und 2 nmol $[^3\text{H}]\text{-Doxyl-}^{\text{G}}_{\text{D1a}}$ (Gangliosidkonzentration: 5.6 mM).
- Lipidvesikel mit ca. 1 mol-% $[^3\text{H}]\text{-Doxyl-}^{\text{G}}_{\text{D1a}}$
 1 mg eines aus synaptischen Membranen extrahierten Lipidgemisches wurde in organischer Lösung mit 10 nmol $[^3\text{H}]\text{-Doxyl-}^{\text{G}}_{\text{D1a}}$ vermischt. Die Lösung wurde eingedampft, der Rückstand über Nacht an der Ölpumpe getrocknet und anschließend unter Behandlung mit Ultraschall (Sonifier B-12 mit Cuphorn, 120 Watt Schalleistung, 1 min) in 30 μl 10 mM Tris/HCl-Puffer pH 7.2 suspendiert. Nach Überführen in eine Probekapillare wurde von dieser Vesikelsuspension das ESR-Spektrum aufgezeichnet.

(Abb. 16) nur mehr $50 \pm 5\%$ des Gangliosidanalogs mizellar und schon $57 \pm 8\%$ membrangebunden vor. Der mizellare Anteil läßt sich in Abb. 16 vor allem am Abweichen des linken und rechten Spektrenendes von der Nulllinie erkennen. Während der anschließenden Aufnahme der ESR-Spektren bei 20 und 37°C trat dann binnen weniger Minuten vollständiger Einbau in die mikrosomalen Membranen ein.

Über die Radioaktivitätsverteilung wurde unter den gleichen Bedingungen der membrangebundene Anteil von $[^3\text{H}]\text{-Doxyl-}^{\text{"G}}_{\text{D1a}}$ ohne Inkubation zu 44 % und nach fünfminütiger Inkubation bei 25°C zu 54 % ermittelt. Eine Trypsinbehandlung mußte dabei unterbleiben, da sie einen weiteren Einbau verursacht hätte. Diese Werte stimmen sehr gut mit den Ergebnissen aus den ESR-Spektren überein, und lassen daher zumindest bei Verwendung von $[^3\text{H}]\text{-Doxyl-}^{\text{"G}}_{\text{D1a}}$ eine Gleichsetzung des nach Zentrifugation membrangebundenen Gangliosids mit inseriertem Gangliosid gerechtfertigt erscheinen. Doch die gute Übereinstimmung darf nicht darüber hinwegtäuschen, daß sie mehr qualitativer Natur ist, weil die Meßwerte wegen des sehr schnellen Einbaus des Gangliosidanalogs in die mikrosomalen Membranen selbst bei niedrigen Temperaturen und neutralem pH-Wert einer ziemlichen Unsicherheit unterliegen (undefinierter Einbau während der Bereitung und Handhabung der Ansätze).

Insgesamt sprechen die Resultate sehr dafür, daß das in den Studien des vorhergehenden Abschnitts als fest membrangebunden bezeichnete $[^3\text{H}]\text{-Gangliosid } G_{\text{D1a}}$ ebenfalls in die mikrosomalen Membranen inseriert ist, wenngleich dieser Analogschluß durch die leider recht unterschiedliche Einbaukinetik von $[^3\text{H}]\text{-Gangliosid } G_{\text{D1a}}$ und $[^3\text{H}]\text{-Doxyl-}^{\text{"G}}_{\text{D1a}}$ an Tragfähigkeit einbüßt. Die verglichen mit $[^3\text{H}]\text{-Gangliosiden}$ größere Einbaugeschwindigkeit spinmarkierter Gangliosidanaloga wurde auch bei Untersuchungen zur Gangliosidaufnahme durch lebende Zellen beobachtet (227). Sie geht sehr wahrscheinlich auf den störenden Einfluß der sperrigen und überdies schwach hydrophilen Doxylgruppierung auf die Packung der Fettsäureketten und eine damit verbundene Labilisierung der mizellaren Aggregate zurück. So haben z.B. Hauser et. al. (77) festgestellt, daß spinmarkierte Fettsäuren die Membranstruktur wesentlich mehr stören als unmarkierte Fettsäuren und auch weniger zur Ausbildung von Clustern neigen.

In Hinblick auf den sialidasekatalysierten Gangliosidabbau bleibt noch zu erwähnen, daß mit dem schnelleren Einbau auch ein schnellerer Abbau des $[^3\text{H}]\text{-Doxyl-}^{\text{"G}}_{\text{D1a}}$ einherging, das ja mit Ausnahme des innersten Zuckers den

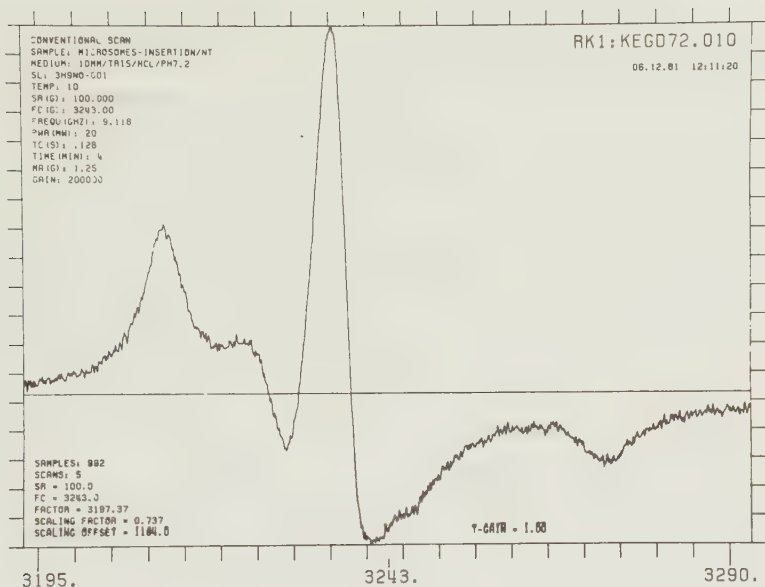


Abb. 16

Insertion von $[^3\text{H}]\text{-Doxyl-}G_{D1a}$ in mikrosomale Membranen bei 0 bis 10°C

Der Ansatz enthielt in einem Endvolumen von 25 μl 0.1 mg mikrosomales Protein (M.F), 5 nmol $[^3\text{H}]\text{-Doxyl-}G_{D1a}$ und 2 mM Tris/HCl-Puffer pH 7.2. Er wurde sofort, ohne vorherige Inkubation bei höheren Temperaturen, in eine Probekapillare gefüllt und nach deren Abschmelzen sofort der ESR-Messung bei 10°C zugeführt (vgl. Abschnitt 6.4.2.).

Die Computerauswertung des Spektrums (Spektrensubtraktion bzw. -simulation) ergab einen Anteil des Spin-Spin-Wechselwirkungssignals mikzellaren $[^3\text{H}]\text{-Doxyl-}G_{D1a}$ von $50 \pm 5\%$ und des Anisotropiesignals membrangebundenen $[^3\text{H}]\text{-Doxyl-}G_{D1a}$ von $57 \pm 8\%$.

gleichen hydrophilen Molekülanteil wie Gangliosid G_{D1a} aufweist. Bei gleicher Versuchsführung wie zu Tab. 5 beschrieben (s. vorhergehenden Abschnitt) und unter Einsatz einer Substratkonzentration von 0.05 mM, waren nach fünfzehnminütiger Inkubation bei 37°C 56 % des angebotenen $[^3\text{H}]\text{-Gangliosids}$ fest membrangebunden und davon wiederum 14 % zu Gangliosid G_{M1} abgebaut worden. Vom zugesetzten $[^3\text{H}]\text{-Doxyl-}G_{D1a}$ jedoch waren 98 % membrangebunden, mit einem $[^3\text{H}]\text{-Doxyl-}G_{M1}$ -Anteil von 20 %. Dieses Ergebnis unterstreicht die Bedeutung des Gangliosideinbaus für die Geschwindigkeit der enzymatischen Spaltung.

Als Zusammenfassung der beiden letzten Abschnitte läßt sich damit folgendes Bild für die Wechselwirkung exogenen, mizellaren Gangliosids G_{D1a} mit den sialidasetragenden mikrosomalen Membranen entwerfen: Ein Teil der Gangliosidmizellen adsorbiert an proteinhaltige Oberflächenstrukturen der Membranen. Dieser Anteil läßt sich mit Proteasen wieder ablösen und wird von der membrangebundenen Sialidase nicht als Substrat akzeptiert. Ein anderer Teil des Gangliosids dagegen bindet fest an die mikrosomalen Membranen und dient der Sialidase als Substrat. In Analogie zum spinmarkierten Gangliosidanalogon $[^3H]$ -Doxyl-" G_{D1a} ", für das zweifelsfrei eine Insertion in mikrosomale Membranen unter Auflösung der mizellaren Struktur nachgewiesen wurde, wird für diesen Anteil ebenfalls eine - zumindest teilweise - Insertion angenommen. Daß ein Teil des proteasestabilen Gangliosids in mizellarer Form fest mit den mikrosomalen Membranen assoziiert sein könnte, läßt sich nicht ausschließen, doch sollte nach Behandlung mit Trypsin, das ja spezifisch nach Aminosäuren mit positiv geladenen Seitengruppen spaltet, die Anzahl der dazu notwendigen, positiv geladenen Bindungsstellen nur mehr gering sein. Überdies läßt das bereits inserierte Gangliosid die Membranen stark negativ auf (vgl. Tab. 5: nach 60 min macht das fest membrangebundene Gangliosid schätzungsweise mehr als 5 mol-% des endogenen Lipidgehalts der mikrosomalen Membranen aus !) und behindert damit zusätzlich eine Adsorption mizellaren Gangliosids.

Zur Kinetik des Gangliosideinbaus läßt sich festhalten, daß Gangliosid G_{D1a} in einer Konzentration von 0.1 mM bei pH 3.6 und physiologischer Ionenstärke mit einer Geschwindigkeit von ca. 0.1 μ mol je Stunde und mg mikrosomalem Protein von den mikrosomalen Membranen aufgenommen wurde. Die Einbaugeschwindigkeit nahm mit steigender Inkubationszeit zwar ab, doch wurden bei den verwendeten Konzentrationen nie eindeutige Hinweise auf eine Sättigung der mikrosomalen Membranen erhalten (vgl. Abb. 31 in Abschnitt 4.1.). Daß Gangliosid G_{D1a} in mikrosomale Membranen wesentlich schneller inseriert als in künstliche Lipidvesikel (eigene Beobachtungen, sowie 259, vgl. auch 25, 26, 55), dürfte in erster Linie den mikrosomalen Membranproteinen zu verdanken sein, die nicht nur als adsorptive Bindungsstellen für Gangliosidmizellen in Frage kommen, sondern auch ihre Eingliederung in die Membran erleichtern dürften, möglicherweise analog zur Katalyse des Lipidaustausches zwischen den beiden Hälften einer Membran durch integrale Membranproteine (Ü 266).

Die Assoziation von Gangliosiden mit lebenden Zellen geht - trotz proteinhaltiger Membranen - ebenfalls langsamer vor sich, als hier mit mikrosomalen

Membranen beobachtet, doch kommen hier die Einbaugeschwindigkeiten z.T. schon in die gleiche Größenordnung (21, 191). Hierfür könnten mehrere Ursachen verantwortlich sein: Zum ersten wurden bei manchen Versuchen Zellmonoschichten verwendet, in denen die Zellen an der Kulturschale und aneinander haften, so daß überhaupt nur ein Bruchteil ihrer Oberfläche zugänglich ist. Zum zweiten bedeckt eine intakte Glykokalyx die Zelloberfläche, die vielleicht den Einbau erschwert, indem sie die Gangliosidmizellen von der eigentlichen Lipiddoppelschicht fernhält. Zum dritten werden die Zeleinbaustudien bei neutralen pH-Werten durchgeführt, die auch im Fall mikrosomaler Membranen nur einen sehr langsamen Einbau zulassen. Die oben angegebene Geschwindigkeit, mit der Gangliosid G_{D1a} in mikrosomale Membranen inseriert, liegt deutlich über der des sialidasekatalysierten Abbaus und kann damit für letztere nicht unmittelbar bestimmend sein. Doch dürfte sie über das Substratangebot die gemessene Sialidaseaktivität durchaus beeinflussen, wie der oben angestellte Vergleich zwischen dem Abbau von $[^3H]$ -Gangliosid G_{D1a} und $[^3H]$ -Doxyl-" G_{D1a} " nahelegt. Daher erscheint es geboten, vor einem weiteren Ausbau des enzymkinetischen Modells erst einmal auf dem Hintergrund der bisher gewonnenen Erkenntnisse dem Einfluß der Bedingungen des enzymatischen Tests, insbesondere des pH-Werts und der Ionenstärke, auf den Gangliosid- G_{D1a} -Einbau und -Abbau genauer nachzugehen.

2.4. Einfluß des Ionenmilieus auf die enzymatische Aktivität der membran- gebundenen Sialidase

Aufgrund der festgestellten Besonderheiten in der Wechselwirkung der membrangebundenen Sialidase mit ihren Substraten sollen hier die in Abschnitt 2.1.3. dargelegten ersten Untersuchungen zur pH-Abhängigkeit der Sialidaseaktivität - gegebenenfalls unter Berücksichtigung des Gangliosideinbaus - überprüft und auf den Einfluß von Art und Konzentration der im Inkubationsansatz enthaltenen Salze ausgedehnt werden.

2.4.1. Einfluß des pH-Werts

In Abschnitt 2.1.3. war eine optimale Sialidaseaktivität bei pH-Werten um 4 festgestellt worden. Diese Versuche wurden nun auf einen größeren pH-Bereich ausgedehnt, um auch Auskunft über die Enzymaktivität unter physio-

logischen, d.h. neutralen pH-Werten zu erhalten. Außerdem interessierte die Auswirkung der Geschwindigkeit des Gangliosideinbaus in die mikrosomalen Membranen auf das pH-Optimum der Gangliosidspaltung. Eine solche Komplikation fällt bei wasserlöslichen Substraten weg und die pH-Abhängigkeit ihres Abbaus sollte ausschließlich von den Eigenschaften der Sialidase selbst festgelegt werden. Dieser einfachere Fall wird daher zuerst behandelt, um eine Grundlage für die Interpretation der Daten über die Gangliosid-G_{D1a}-Spaltung abzugeben.

Der pH-abhängige Umsatz der beiden wasserlöslichen Sialidasesubstrate 4-MU-NeuAc (Abb. 17) und [³H]-Sialyllactit (Abb. 18) zeigt nahezu identische Kurvenverläufe mit einem Optimum bei pH 3.9 und einer langen Schulter zwischen pH 5 und 7 mit 20 bis 30 % der maximalen Aktivität. Die Unstetigkeit in der 4-MU-NeuAc-Kurve bei pH 7 beruht sehr wahrscheinlich auf einem Artefakt durch den Pufferwechsel.

Eine starke Fluidisierung der mikrosomalen Membran, etwa durch Lachgas oder Hexanol, wie sie in späteren Kapiteln noch wichtig werden wird, verursachte - wie für das Substrat [³H]-Sialyllactit nachgewiesen - lediglich eine leichte Verschiebung des pH-Optimums ins Alkalische um bis zu eine halbe pH-Einheit, ohne den Maximalwert des Umsatzes zu verändern. Beim üblichen Inkubations-pH von 3.6 kann das aber doch ausreichen, eine bis zu 50 %ige Hemmung der Sialidaseaktivität infolge einer Membranfluidisierung vorzutauschen.

Für die Spaltung des lipophilen Sialidasesubstrats Gangliosid G_{D1a} ergibt die pH-Abhängigkeit (Abb. 19) im Prinzip genau das gleiche Kurvenbild wie für wasserlösliche Substrate, doch liegen die pH-Optima bei gleichen Inkubationsbedingungen jeweils um ca. eine halbe pH-Einheit niedriger. Membranfluidisierende Agentien haben wiederum die Tendenz, das pH-Optimum ein wenig ins Alkalische zu verschieben und führen insbesondere zu einer starken Stimulierung des Gangliosidumsatzes, auf die in späteren Kapiteln genauer eingegangen wird (vgl. auch Einleitung).

Die im Vergleich zu den wasserlöslichen Substraten zwar nicht viel, aber doch durchgängig weiter ins Saure verlagerten pH-Optima für den Gangliosidumsatz lassen die Frage aufkommen, ob dies eine Folge des dem Abbau vorgeschalteten Gangliosideinbaus in die mikrosomalen Membranen sein könnte. Daher wurde nach dem in Abschnitt 2.3.5.1. beschriebenen Verfahren in Abhängigkeit vom Inkubations-pH die während einer halbstündigen Inkubation in die mikrosomalen Membranen eingebaute Gangliosidmenge und die daraus von

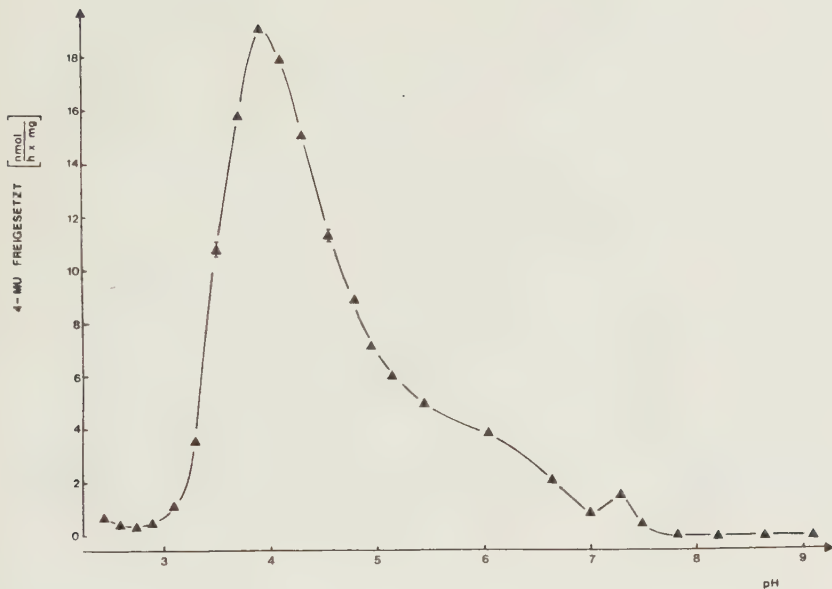


Abb. 17

pH-Abhängigkeit der Spaltung von 4-MU-NeuAc durch die membrangebundene Sialidase

0.1 ml Ansatz enthielten 100 µg mikrosomales Protein (M.F.), 0.2 mM 4-MU-NeuAc, Puffer vom angegebenen pH-Wert (zwischen pH 2.45 und 5.15 : 100 mM Formiatpuffer, zwischen pH 5.45 und 7.0 : 50 mM Maleatpuffer, zwischen pH 7.3 und 9.1 : 50 mM Tris/HCl-Puffer) und NaCl entsprechend einer Endionenstärke von 150 mM. Nach einstündiger Inkubation bei 37° C wurde der Substratumsatz fluorimetrisch ermittelt (s. Abschnitt 6.3.1.).

Angegeben sind die Mittelwerte von Doppelbestimmungen, die Standardabweichungen sind eingezeichnet.

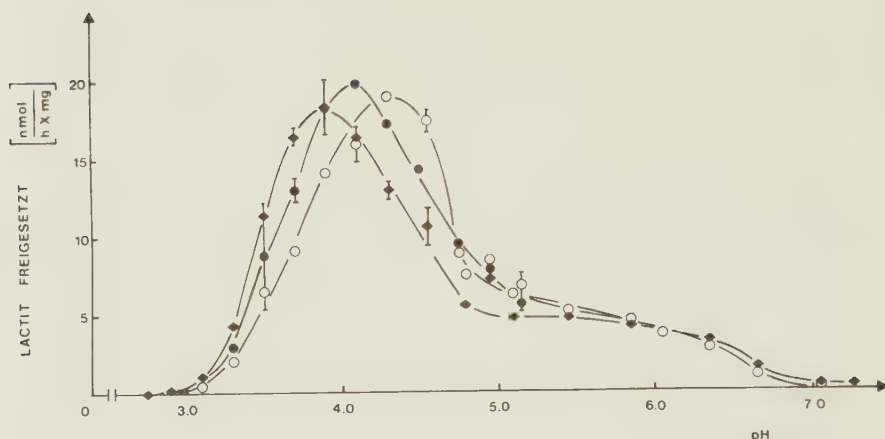


Abb. 18

pH-Abhängigkeit der Spaltung von $[^3\text{H}]$ -Sialyllactit durch die membrangebundene Sialidase unter verschiedenen Bedingungen

0.1 ml Ansatz enthielten 200 μg mikrosomales Protein (M.A), 2 mM $[^3\text{H}]$ -Sialyllactit, Puffer vom angegebenen pH-Wert (zwischen pH 2.45 und 5.15 : 100 mM Formiatpuffer, zwischen pH 4.8 und 7.25 : 50 mM Maleatpuffer), NaCl entsprechend einer Endionenstärke von 150 mM und gegebenenfalls 24 mM n-Hexanol (zuge setzt in Form der gesättigten wässrigen Lösung der Konzentration 61 mM). Nach einstündiger Inkubation bei 37° C, gegebenenfalls im Autoklaven (207) unter einem Lachgasdruck von 30 atm, wurde der Substratumsatz radiometrisch ermittelt (s. Abschnitt 6.3.2.).

Angegeben sind die Mittelwerte von Doppelbestimmungen, die Standardabweichungen sind eingezeichnet.

- ◆ Keine besonderen Inkubationsbedingungen
- Inkubation in Gegenwart von 24 mM n-Hexanol
- Inkubation unter 30 atm Lachgas

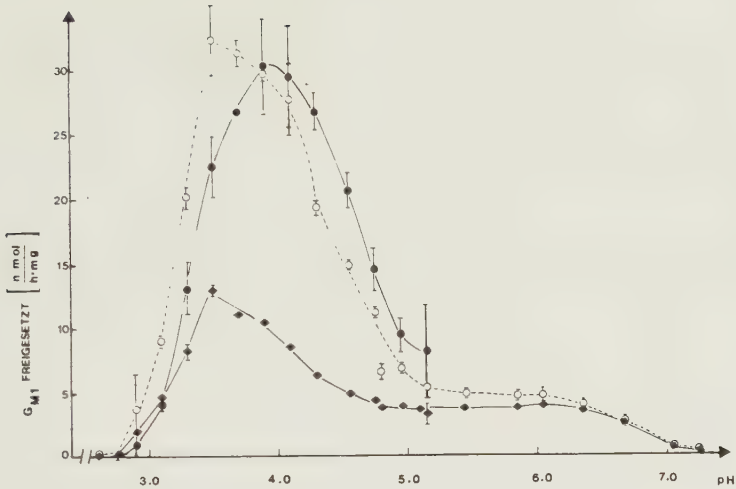


Abb. 19

pH-Abhängigkeit der Spaltung von Gangliosid G_{01a} durch die membrangebundene Sialidase unter verschiedenen Bedingungen

0.1 ml Ansatz enthielten 100 μ g mikrosomales Protein (M.A), 0.1 mM [3 H]-Gangliosid G_{01a} , Puffer vom angegebenen pH-Wert (zwischen pH 2.45 und 5.15 : 100 mM Formiatpuffer, zwischen pH 4.8 und 7.25 : 50 mM Maleatpuffer), NaCl entsprechend einer Endionenstärke von 150 mM und gegebenenfalls 24 mM n-Hexanol (zuge setzt in Form der gesättigten wässrigen Lösung der Konzentration 61 mM). Nach einstündiger Inkubation bei 37° C, gegebenenfalls im Autoklaven (207) unter einem Lachgasdruck von 30 atm, wurde der Gangliosidumsatz radiometrisch ermittelt (s. Abschnitt 6.3.3.).

Angegeben sind die Mittelwerte von Doppelbestimmungen, die Standardabweichungen sind eingezeichnet.

- ◆ Keine besonderen Inkubationsbedingungen
- Inkubation in Gegenwart von 24 mM n-Hexanol
- Inkubation unter 30 atm Lachgas

der membrangebundenen Sialidase freigesetzte Gangliosid- G_{M1} -Menge bestimmt (Abb. 20). Die schnellste Gangliosidinsertion war unterhalb von pH 3.5 zu verzeichnen; zwischen pH 3.5 und 5 nahm sie dann stark ab und blieb über pH 5 konstant bei etwa 2 nmol, d.h. bei 20 % der angebotenen Gangliosidmenge.

Über die Ursachen dieses auffälligen Einbauverhaltens lassen sich nur Mutmaßungen anstellen. Eine Abnahme der Membranstabilität und der negativen Ladung sowohl der mikrosomalen Membranen als auch unter Umständen der Gangliosidmizellen (der pK_s -Wert für NeuAc liegt bei ca. 2.7, s. Einleitung; vgl. aber 267 und 52 zur Anhebung des pK_s -Werts saurer Gruppen, wenn sie Molekülbestandteil von Lipiden werden) mit abnehmenden pH-Werten könnte eine Rolle spielen. Außerdem scheint der Proteingehalt der mikrosomalen Membranen von Bedeutung zu sein, da der Gangliosideinbau in proteinfreie, künstliche Lipidvesikel gerade bei neutralen pH-Werten mit maximaler Geschwindigkeit erfolgt, wie andere Autoren berichten (25, 26).

Die Kurve für das auf Grund der Sialidaseeinwirkung in den mikrosomalen Membranen entstandene Gangliosid G_{M1} verläuft weitgehend parallel zu derjenigen für die Gangliosidinsertion und weicht nur an zwei Punkten davon ab: Unter pH 3 und über pH 7.5 kam im Unterschied zum Einbau die Gangliosidsplaltung rasch zum Erliegen, sehr wahrscheinlich wegen der dann sehr schnell ablaufenden Denaturierung der Sialidase (s. Abschnitt 2.2.3.). Das Optimum liegt wieder bei 3.5, ganz in Übereinstimmung mit Abb. 19. Bezieht man aber das freigesetzte Gangliosid G_{M1} auf die dem Enzym tatsächlich zur Verfügung stehende Menge des eingebauten Gangliosids, die ja in diesem pH-Bereich ebenfalls stark ansteigt, so wird deutlich, daß die Sialidase eigentlich bei pH 3.7 bis 3.8 maximal aktiv ist, nun in recht gutem Einklang mit den Ergebnissen für den Umsatz wasserlöslicher Substrate. Des weiteren kommt in der Kurve für den relativen Gangliosidabbau sehr ausgeprägt die lange Aktivitätsschulter bis pH 7.5 zur Geltung, mit einer gegenüber dem Maximalwert nur um die Hälfte verringerten Umsatzgeschwindigkeit. Diese Relation mag zwar durch die bei verschiedenen pH-Werten unterschiedliche Substratmenge, die der Sialidase zur Verfügung steht, verfälscht werden (veränderter Bereich in der $V/[S]$ -Beziehung der Enzymkinetik, veränderte Relation des exogenen zu den endogenen Substraten), doch belegt sie eindeutig, daß die membrangebundene Sialidase auch im neutralen und schwach sauren pH-Bereich noch erhebliche katalytische Aktivität besitzt.

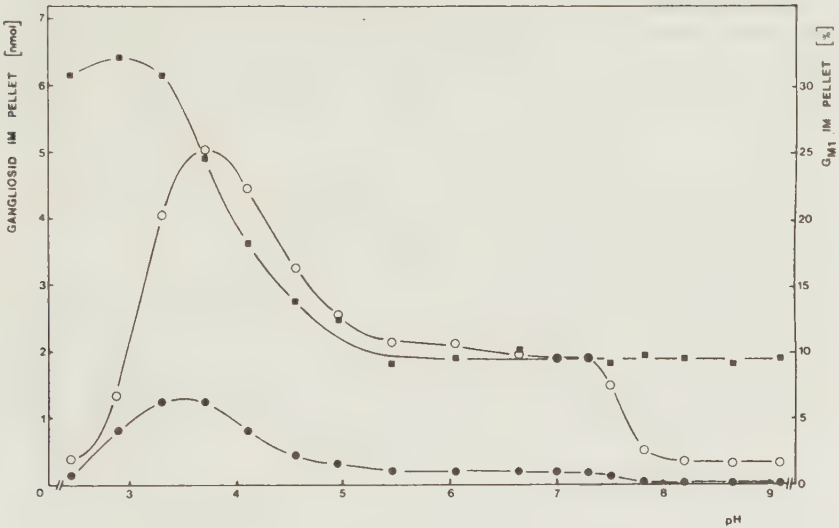


Abb. 20

Gehalt mikrosomaler Membranen an $[^3\text{H}]$ -Gangliosid G_{D1a} und G_{M1} nach Inkubation von mizellarem $[^3\text{H}]$ -Gangliosid G_{D1a} mit membrangebundener Sialidase bei verschiedenen pH-Werten

0.25 ml Ansatz enthielten 250 μg mikrosomales Protein (M.F.), 0.1 mM $[^3\text{H}]$ -Gangliosid G_{D1a} , Puffer vom angegebenen pH-Wert (zwischen pH 2.45 und 4.95 : 100 mM Formiatpuffer, zwischen pH 5.45 und pH 7.0 : 50 mM Maleatpuffer, zwischen pH 7.3 und 9.1 : 50 mM Tris/HCl-Puffer) und NaCl entsprechend einer Endionenstärke von 150 mM. Nach halbstündiger Inkubation bei 37° C wurde dem Ansatz ein Aliquot von 100 μl entnommen und auf pH 7.5 – 7.8 gebracht (mit 0.25 M Tris- bzw. verdünnter HCl-Lösung). Nach halbstündiger Inkubation bei 37° C in Gegenwart von 0.25 % Trypsin wurden die mikrosomalen Membranen abzentrifugiert und ihr Gehalt an $[^3\text{H}]$ -Gangliosid G_{D1a} und G_{M1} radiometrisch ermittelt (zur genauen Durchführung vgl. Abschnitt 6.4.1.).

- Gehalt der mikrosomalen Membranen an Gangliosid G_{D1a} und G_{M1} (Gesamtgangliosidgehalt)
- Gehalt der mikrosomalen Membranen an Gangliosid G_{M1}
- Prozentualer Anteil von Gangliosid G_{M1} am Gesamtgangliosidgehalt der mikrosomalen Membranen; es gilt die rechte Ordinatenskala

Eine exakte Auskunft über den sialidasekatalysierten Gangliosidumsatz bei saurem und neutralem pH-Wert kann die Messung des Abbaus von [^3H]-Doxyl- G_{D1a} und von endogenem Substrat geben. Letzteres ist ja sowieso Bestandteil der mikrosomalen Membranen und ersteres wird im Sauren wie im Neutralen nahezu augenblicklich und vollständig in die Membranen eingebaut (s. Abschnitt 2.3.5.2.). Das Gangliosidanalogen [^3H]-Doxyl- G_{D1a} (2 nmol auf 100 μg mikrosomales Protein, M.F) wurde mit einer Geschwindigkeit von 15.4 $\frac{\text{nmol}}{\text{h} \cdot \text{mg}}$ bei pH 3.6 (50 mM Formiatpuffer, Ionenstärke 150 mM) und von 6.9 $\frac{\text{nmol}}{\text{h} \cdot \text{mg}}$ bei pH 7.2 (6.5 mM Tris/HCl-Puffer) gespalten. Für endogenes Gangliosid G_{D1a} (gleiche Versuchsdurchführung wie in Abschnitt 2.3.1.) lauten die entsprechenden Umsatzraten 7.3 $\frac{\text{nmol}}{\text{h} \cdot \text{mg}}$ (50 mM Formiatpuffer pH 3.6, Ionenstärke 23 mM) und 3.2 $\frac{\text{nmol}}{\text{h} \cdot \text{mg}}$ (2.5 mM Tris/HCl-Puffer pH 7.2).

In ausgezeichneter Übereinstimmung folgt also aus allen drei verwendeten Meßverfahren für die Sialidaseaktivität, daß der Abbau des in die mikrosomalen Membranen inserierten Gangliosids G_{D1a} zwar bei pH 3.6 bis 3.8 mit maximaler, bei neutralem pH aber immerhin noch mit knapp halbmaximaler Geschwindigkeit abläuft. Dieses auffällige pH-Profil für die Aktivität der membrangebundenen Sialidase erinnert an die bereits in der Einleitung kurz angeschnittene Frage, ob die benutzte Enzympräparation möglicherweise zwei Sialidasen, eine mit neutralem und eine mit saurem pH-Optimum, enthalten könnte, doch soll dieses Problem noch etwas zurückgestellt und erst der Einfluß des Ionenmilieus auf die Sialidase weiter behandelt werden.

2.4.2. Einfluß der Pufferanionen

An Anionen enthielten die Testansätze für die membrangebundene Sialidase neben Chlorid nur die Anionen des jeweils verwendeten Puffers. Da von Cl^- keine speziellen Auswirkungen auf die membrangebundene Sialidase zu erwarten waren (186, 171) und je nach Inkubations-pH gelegentlich verschiedene Puffer verwendet wurden, erschien nur eine Untersuchung zum Einfluß des Puffers notwendig. Es stellte sich heraus (Tab. 6), daß in Gegenwart von Formiat-, Acetat- und Glykolatpuffern gleichen pH-Werts und gleicher Ionenstärke im Rahmen der Meßgenauigkeit völlig identische Umsatzraten für Gangliosid G_{D1a} erzielt wurden, auch bei erhöhter Membranfluidität durch Lachgas. Im folgenden fanden in der Regel Formiatpuffer Verwendung, da sie im pH-Bereich zwischen 3.5 und 4.0 optimal puffern, ab und zu aber

Tab. 6

Abbau von Gangliosid G_{01a} durch die membrangebundene Sialidase in Gegenwart verschiedener Puffer

0.1 ml Ansatz enthielten 100 µg mikrosomales Protein (M.A), 0.1 mM [³H]-Gangliosid G_{01a}, 0.1 M Puffer vom angegebenen pH-Wert und der angegebenen Art, sowie NaCl entsprechend einer Endionenstärke von 150 mM. Nach einstündiger Inkubation bei 37° C, gegebenenfalls im Autoklaven (207) unter einem Lachgasdruck von 30 atm, wurde der Gangliosidumsatz radiometrisch ermittelt (s. Abschnitt 6.3.3.).

Die Umsatzraten, Mittelwerte von drei Bestimmungen, sind unter Angabe der Standardabweichungen in $\frac{\text{nmol}}{\text{h} \cdot \text{mg}}$ aufgeführt.

	Abbau bei pH 3.7		Abbau bei pH 3.9	
	unter Lachgas		unter Lachgas	
Formiatpuffer	9.3 ± 0.4	29.1 ± 1.4	7.6 ± 0.2	30.2 ± 2.7
Acetatpuffer	8.5 ± 0.6	27.9 ± 2.1	7.1 ± 0.5	28.6 ± 2.4
Glykolatpuffer	10.2 ± 0.4	29.5 ± 2.2	8.0 ± 0.4	31.1 ± 2.4

auch Acetatpuffer auf Grund der früher im Arbeitskreis üblichen Inkubationsbedingungen (223, 208).

2.4.3. Einfluß der Salzkonzentration

Die enzymatischen Tests mit der membrangebundenen Sialidase wurden meist in Gegenwart von Natriumchlorid durchgeführt, um eine physiologische Ionenstärke von 150 mM einzuhalten, obwohl dies - wie in früheren Abschnitten bereits mehrfach angeklungen - eine Verringerung der Umsatzraten und der Enzymstabilität mit sich brachte. In diesem Abschnitt soll nun systematisch die Abhängigkeit der sialidasekatalysierten Substratspaltung von der Ionenstärke im Testansatz, repräsentiert durch die Natriumchloridkonzentration, behandelt werden. In die Untersuchungen wurde auch Calciumchlorid miteinbezogen, das ja in vielen physiologischen Prozessen eine sehr wichtige Rolle spielt und gerade auch mit negativ geladenen Lipiden in Wechselwirkung tritt (z.B. 172, 95, 98, Ü 76, 267, 260).

Frei von besonderen Komplikationen auf Grund der membrangebundenen Natur der Sialidase sollte wiederum der Umsatz wasserlöslicher Substrate sein, der für 4-MU-NeuAc in Abb. 21 in seiner Abhängigkeit von der Natriumchloridkonzentration und in Abb. 22 in seiner Abhängigkeit von der Calciumchloridkonzentration dargestellt ist, beides auch in Gegenwart zweier Konzentrationen des membranfluidisierenden Alkohols n-Hexanol. Abgesehen von niedrigen Salzkonzentrationen unter 50 mM ergab sich für alle Bedingungen übereinstimmend, daß die Sialidaseaktivität mit steigenden Salzkonzentrationen stark abnimmt und über einer Na^+ -Konzentration von 0.5 M bzw. einer Ca^{2+} -Konzentration von 0.15 M praktisch zum Erliegen kommt. Hexanol verursachte unabhängig davon eine zusätzliche leichte Inhibierung, insbesondere bei der recht hohen Konzentration von 24 mM (entspricht 40 % der Sättigungskonzentration in Wasser !). Bei Na^+ -Konzentrationen unter 50 mM scheint sich der Alkoholeinfluß umzukehren, doch läßt die ungewöhnlich hohe Streuung der Meßwerte in diesem Bereich keine klare Aussage zu. Eine mangelhafte Pufferkapazität der Puffer mit geringen Ionenstärken wurde durch Überprüfung der pH-Werte in simulierten Testansätzen als Ursache des unregelmäßigen Kurvenverlaufs ausgeschlossen. Bei niedrigen Ca^{2+} -Konzentrationen durchlaufen die Umsatzkurven ein je nach Hexanolkonzentration mehr oder weniger ausgeprägtes Maximum bei etwa 10 mM; im Fall von Natriumchlorid läßt sich ein solches Maximum nicht oder höchstens andeutungsweise beobachten. Eine Reduzierung der Abbaugeschwindigkeit auf die Hälfte des Maximalwerts trat bei 80 bis 100 mM NaCl bzw. etwa 50 mM CaCl_2 (entspricht einer Ionenstärke von 150 mM) ein. Normiert auf gleiche Ionenstärken bewirkte Ca^{2+} also eine geringere Hemmung als Na^+ , was zusammen mit dem Kurvenverlauf die Vermutung nahelegt, daß sich bei Ca^{2+} möglicherweise ein unspezifischer, hemmender Effekt infolge zunehmender Ionenstärke und ein für Ca^{2+} spezifischer, aktivierender Effekt überlagern.

In mancher Hinsicht genau umgekehrt stellt sich die Situation beim Abbau des lipophilen Gangliosidsubstrats durch die membrangebundene Sialidase dar (Abb. 23 und 24). Zwar sanken auch hier, ganz ähnlich wie mit 4-MU-NeuAc, bei hohen Salzkonzentrationen die Umsatzraten bis nahe Null ab, doch verursachte bei niedrigen Konzentrationen gerade das Ca^{2+} die viel stärkere Hemmung. Außerdem stimulierte Hexanol jetzt die Substratspaltung, was analog zu den Ergebnissen mit Lachgas (vgl. Einleitung, sowie Tab. 2 und Abb. 19) auf eine Erhöhung der Fluidität der mikrosomalen Membranen zurückzuführen ist, auf die in späteren Kapiteln noch eingegangen wird. Interessanterweise

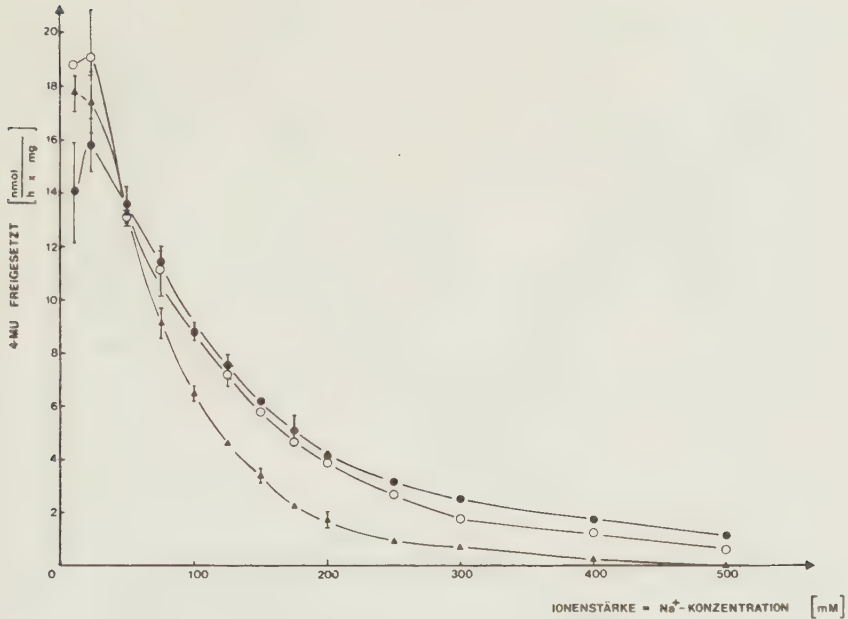


Abb. 21

Einfluß der Na^+ -Konzentration auf die sialidasekatalysierte Spaltung von 4-MU-NeuAc in Gegenwart verschiedener Konzentrationen an n-Hexanol

0.1 ml Ansatz enthielten 100 μg mikrosomales Protein (M.8), 0.2 mM 4-MU-NeuAc, 50 mM (Na^+ -) Formiatpuffer pH 3.6 (Ausnahme: Der Puffer der niedrigsten Ionenstärke von 11 mM hatte nur eine Formiatkonzentration von 25 mM) und NaCl entsprechend der angegebenen Na^+ -Gesamtkonzentration, sowie gegebenenfalls n-Hexanol (zuge setzt in Form der gesättigten wässrigen Lösung der Konzentration 61 mM). Nach einstündiger Inkubation bei 37° C wurde der Substratumsatz fluorimetrisch ermittelt (s. Abschnitt 6.3.1.).

Angegeben sind die Mittelwerte von Doppelbestimmungen, die Standardabweichungen sind eingezeichnet.

● Ohne Zusatz von n-Hexanol

○ Mit 12 mM n-Hexanol

▲ Mit 24 mM n-Hexanol

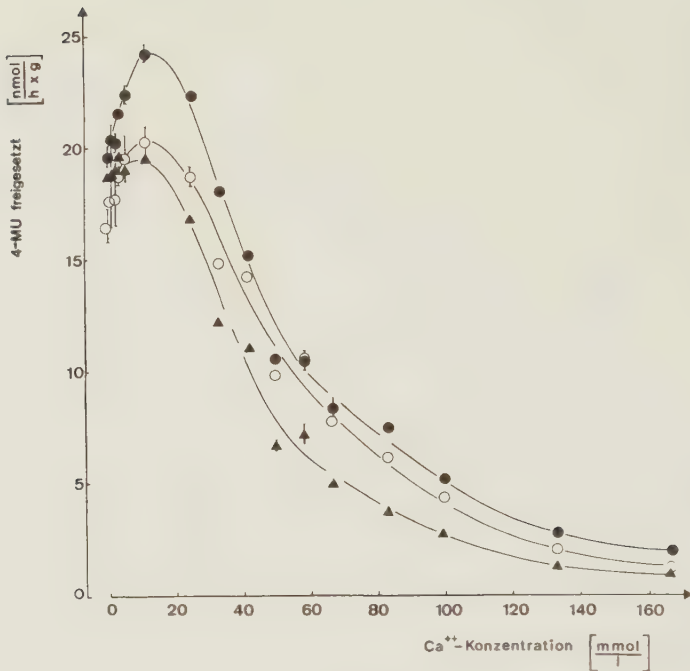


Abb. 22

Einfluß der Ca^{2+} -Konzentration auf die sialidasekatalysierte Spaltung von 4-MU-NeuAc in Gegenwart verschiedener Konzentrationen an n-Hexanol

0.1 ml Ansatz enthielten 100 µg mikrosomales Protein (M.B), 0.2 mM 4-MU-NeuAc, 50 mM (Ca^{2+} -) Formiatpuffer pH 3.6 und CaCl_2 entsprechend der angegebenen Ca^{2+} -Gesamtkonzentration (Ausnahmen: Die Puffer der vier niedrigsten Ca^{2+} -Konzentrationen, d.h. unter 11 mM Ca^{2+} , hatten nur eine Formiatkonzentration von 25 mM. Außerdem enthielten die Puffer mit weniger als 5 mM Ca^{2+} zusätzlich noch Na^+ , damit diese Pufferstärke aufrecht erhalten werden konnte), sowie gegebenenfalls n-Hexanol (zugesezt in Form der gesättigten wässrigen Lösung). Nach einstündiger Inkubation bei 37° C wurde der Substratumsatz fluorimetrisch ermittelt (s. Abschnitt 6.3.1.). Angegeben sind die Mittelwerte von Doppelbestimmungen, die Standardabweichungen sind eingezeichnet.

- Ohne Zusatz von n-Hexanol
- Mit 12 mM n-Hexanol
- ▲ Mit 24 mM n-Hexanol

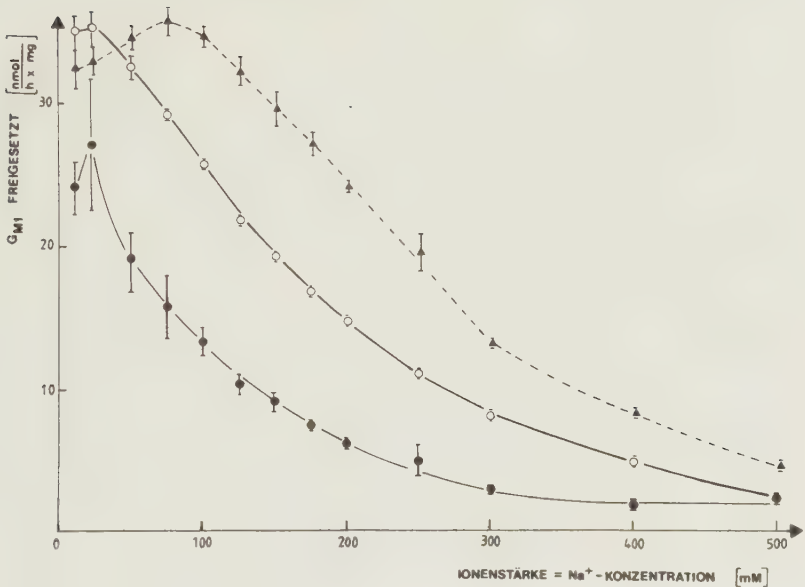


Abb. 23

Einfluß der Na⁺-Konzentration auf die sialidasekatalysierte Spaltung von Gangliosid G_{D1a} in Gegenwart verschiedener Konzentrationen an n-Hexanol

0.1 ml Ansatz enthielten 100 µg mikrosomales Protein (M.B.), 0.1 mM [³H]-Gangliosid G_{D1a}, 50 mM Na⁺-Formiatpuffer pH 3.6 (Ausnahme: Der Puffer der niedrigsten Ionenstärke von 10 mM hatte nur eine Formiatkonzentration von 25 mM) und NaCl entsprechend der angegebenen Na⁺-Gesamtkonzentration, sowie gegebenenfalls n-Hexanol (zugesezt in Form der gesättigten wässrigen Lösung). Nach einstündiger Inkubation bei 37° C wurde der Gangliosidumsatz radiometrisch ermittelt (s. Abschnitt 6.3.3.).

Angegeben sind die Mittelwerte von Dreifachbestimmungen die Standardabweichungen sind eingezeichnet.

- Ohne Zusatz von n-Hexanol
- Mit 12 mM n-Hexanol
- ▲ Mit 24 mM n-Hexanol

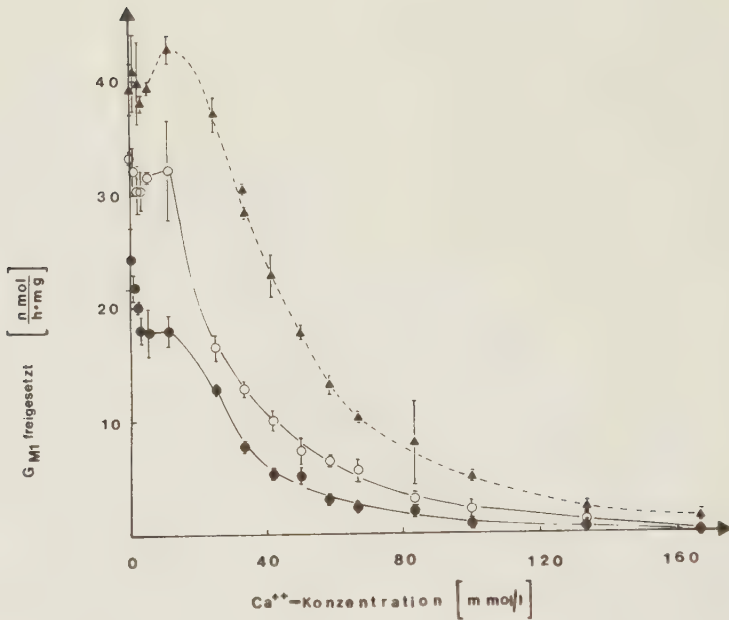


Abb. 24

Einfluß der Ca^{2+} -Konzentration auf die sialidasekatalysierte Spaltung von Gangliosid G_{01a} in Gegenwart verschiedener Konzentrationen an n-Hexanol

0.1 ml Ansatz enthielten 100 µg mikrosomales Protein (M.B), 0.1 mM $[\text{}^3\text{H}]$ -Gangliosid G_{01a} , 50 mM (Ca^{2+} -)Formiatpuffer pH 3.6 und CaCl_2 entsprechend der angegebenen Ca^{2+} -Gesamtkonzentration (Ausnahme: Die Puffer der vier niedrigsten Ca^{2+} -Konzentrationen, d.h. unter 11 mM Ca^{2+} , hatten nur eine Formiatkonzentration von 25 mM. Außerdem enthielten die Puffer mit weniger als 5 mM Ca^{2+} zusätzlich noch Na^+ , damit diese Pufferstärke aufrecht erhalten werden konnte), sowie gegebenenfalls n-Hexanol (zuge setzt in Form der gesättigten wässrigen Lösung). Nach einstündiger Inkubation bei 37° C wurde der Gangliosidumsatz radiometrisch ermittelt (s. Abschnitt 6.3.3.).

Angegeben sind die Mittelwerte von in der Regel Dreifachbestimmungen, die Standardabweichungen sind eingezeichnet.

- Ohne Zusatz von n-Hexanol
- Mit 12 mM n-Hexanol
- ▲ Mit 24 mM n-Hexanol

fiel diese Stimulierung bei niedrigen Na^+ -Konzentrationen deutlich geringer aus, so als käme die Wirkung des Hexanols erst bei höheren Ionenstärken zum Tragen.

Auch bei kleinen Ca^{2+} -Konzentrationen nahm der Faktor für die von Hexanol vermittelte Umsatzsteigerung mit der Ca^{2+} -Konzentration zu, doch sieht es hier so aus, als würde der Alkohol eher die von bereits sehr wenig Ca^{2+} verursachte Hemmung des Gangliosidabbaus wieder aufheben. Dieser hemmende Einfluß niedriger Ca^{2+} -Konzentrationen, der offensichtlich über bloße Ionenstärkeeffekte hinausgeht, beruht eventuell auf einer - aus vielen Untersuchungen (10, 164, 147, 136) bekannten - Bildung von Ca^{2+} -Gangliosid-Komplexen, die dann wegen der verringerten Ladungsabstoßung zu Gangliosid-Clustern zusammentreten (7, 233, vgl. Einleitung) und sich so der Wechselwirkung mit der Sialidase teilweise entziehen. Der entgegengesetzte, leicht stimulierende Effekt kleiner Ca^{2+} -Konzentrationen auf den Umsatz des wasserlöslichen Substrats könnte dann lediglich die von Ca^{2+} verursachte Behinderung des Abbaus konkurrierender, endogener Gangliosidsubstrate widerspiegeln. Der besondere Einfluß von Ca^{2+} auf den Gangliosidumsatz kommt auch in der Höhe der Salzkonzentrationen zum Ausdruck, die für eine Hemmung auf den halbmaximalen Wert ausreichen. Je nach Hexanolkonzentration schwanken diese Konzentrationen zwischen 100 und 260 mM für Na^+ und zwischen 30 und 50 mM für Ca^{2+} (entspricht Ionenstärken zwischen 90 und 150 mM). Für Na^+ liegen sie also gleich oder, infolge des Alkoholeinflusses, höher als beim Umsatz von wasserlöslichem Substrat, für Ca^{2+} jedoch niedriger oder gleich.

Von diesen Feinheiten einmal abgesehen, wird aber der sialidasekatalysierte Abbau von 4-MU-NeuAc und Gangliosid G_{D1a} von höheren Salzkonzentrationen recht ähnlich inhibiert, so daß hier der im Fall des lipophilen Substrats vorgeschaltete Einbau in die mikrosomalen Membranen keine große Rolle zu spielen scheint. Cestaro und Mitarbeiter (25, 26, 259) hatten jedoch über eine Hemmung des Gangliosideinbaus in künstliche Lipidvesikel mit zunehmender Ionenstärke berichtet, und so wurde - ganz analog zur im vorhergehenden Abschnitt beschriebenen pH-Abhängigkeit - die Auswirkung der Na^+ -Konzentration auf die Gangliosidininsertion in die mikrosomalen Membranen bestimmt (Abb. 25). Tatsächlich nahm die eingebaute Gangliosidmenge mit steigender Ionenstärke kontinuierlich ab, recht ähnlich verhielt sich aber auch der auf diese Gangliosidmenge bezogene relative Gangliosidumsatz, der ja konstant bleiben oder sogar ansteigen sollte (je nach Lage der Michaelis-

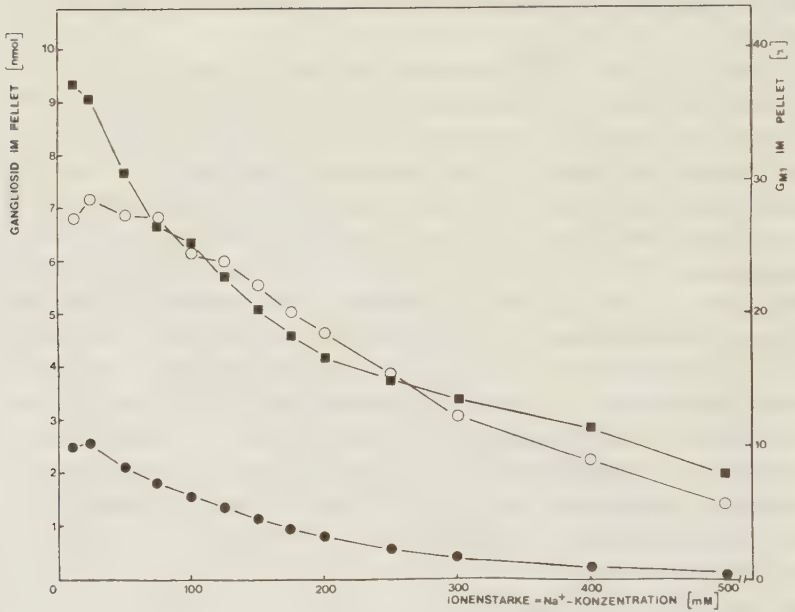


Abb. 25

Gehalt mikrosomaler Membranen an [³H]-Gangliosid G_{D1a} und G_{M1} nach Inkubation von mizellarem [³H]-Gangliosid G_{D1a} mit membrangebundener Sialidase bei verschiedenen Ionenstärken

0.25 ml Ansatz enthielten 250 µg mikrosomales Protein (M.F.), 0.1 mM [³H]-Gangliosid G_{D1a}, 50 mM (Na⁺-) Formiatpuffer pH 3.6 (Ausnahme: Der Puffer der niedrigsten Ionenstärke von 11 mM hatte nur eine Formiatkonzentration von 25 mM) und NaCl entsprechend der angegebenen Na⁺-Gesamtkonzentration. Nach halbstündiger Inkubation bei 37° C wurde dem Ansatz ein Aliquot von 100 µl entnommen und neutralisiert. Nach halbstündiger Inkubation bei 37° C in Gegenwart von 0.25 % Trypsin wurden die mikrosomalen Membranen abzentrifugiert und ihr Gehalt an [³H]-Gangliosid G_{D1a} und G_{M1} radiometrisch ermittelt (zur genauen Durchführung s. Abschnitt 6.4.1., vgl. auch Abschnitt 2.3.5.1.).

- Gehalt der mikrosomalen Membranen an Gangliosid G_{D1a} + G_{M1} (Gesamtgangliosidgehalt)
- Gehalt der mikrosomalen Membranen an Gangliosid G_{M1}
- Prozentualer Anteil von Gangliosid G_{M1} am Gesamtgangliosidgehalt der mikrosomalen Membranen (es gilt die rechte Ordinatenkala)

Konstante für die Enzymreaktion), falls nur ein vermindertes Substratangebot in den mikrosomalen Membranen für die Inhibierung des Gangliosidabbaus durch höhere Salzkonzentrationen verantwortlich wäre. Damit wird deutlich, daß der verminderte Gangliosideinbau zwar die mit dem normalen Testverfahren (z.B. Abb. 23) beobachtete Hemmung des Gangliosidumsatzes durch hohe Ionenstärken verschärft, daß aber auch nach dessen Berücksichtigung noch eine "echte" Hemmung bestehen bleibt.

Die Richtigkeit dieser Feststellung sollte sich am eindeutigsten und ohne Komplikationen durch den Einbau anhand des Abbaus endogenen Gangliosids durch die membrangebundene Sialidase in Gegenwart verschiedener Na^+ -Konzentrationen nachweisen lassen. In Abb. 26 ist die zeitliche Abnahme des prozentualen Anteils von Gangliosid G_{D1a} am endogenen Gangliosidgehalt der mikrosomalen Membranen nach Inkubation in Gegenwart einer Ionenstärke von 23 und 150 mM dargestellt. Bei niedriger Salzkonzentration wurde das endogene Gangliosid G_{D1a} mit einer anfänglichen Geschwindigkeit von $7.3 \frac{\text{nmol}}{\text{h} \cdot \text{mg}}$ gespalten (berechnet unter Zugrundelegung eines Gesamtgehalts an endogenen Gangliosiden von $20 \frac{\text{nmol}}{\text{mg Protein}}$, vgl. Abschnitt 2.3.1.), bis es nach längeren Inkubationszeiten vollständig verbraucht war. Die höhere Na^+ -Konzentration von 150 mM dagegen verursachte eine Herabsetzung der mittleren Umsatzrate während der ersten halben Stunde auf $4.1 \frac{\text{nmol}}{\text{h} \cdot \text{mg}}$ und brachte bei längeren Inkubationszeiten die enzymatische Reaktion rasch zum Erliegen. Die beobachtete Verringerung der anfänglichen Reaktionsgeschwindigkeit auf gut die Hälfte stimmt gut mit den Ergebnissen aus den Abb. 23 und 25 überein und bestätigt, daß der Einbau exogenen Gangliosids für die Hemmung seines Abbaus durch höhere Salzkonzentrationen nur untergeordnete Bedeutung hat. Das nahezu völlige Erlöschen der Sialidaseaktivität bereits nach wenigen Stunden der Inkubation in Gegenwart der größeren Na^+ -Konzentration legt nahe, daß bei höheren Ionenstärken entweder nur ein kleiner Teil der endogenen Ganglioside dem Sialidaseangriff ausgesetzt ist oder die Sialidase rasch inaktiviert wird. Unter Berücksichtigung der Resultate aus Abschnitt 2.2.3. erscheint letzteres, also eine zunehmende Denaturierung des Enzyms, als das wesentlich wahrscheinlichere.

Mit diesen Untersuchungen war die Überprüfung des Einflusses der Inkubationsbedingungen auf die Aktivität der membrangebundenen Sialidase in soweit abgeschlossen. Der in Abschnitt 2.1.3. festgelegte pH-Wert von 3.6 für die routinemäßigen Enzymtests wurde im folgenden meist beibehalten, obwohl

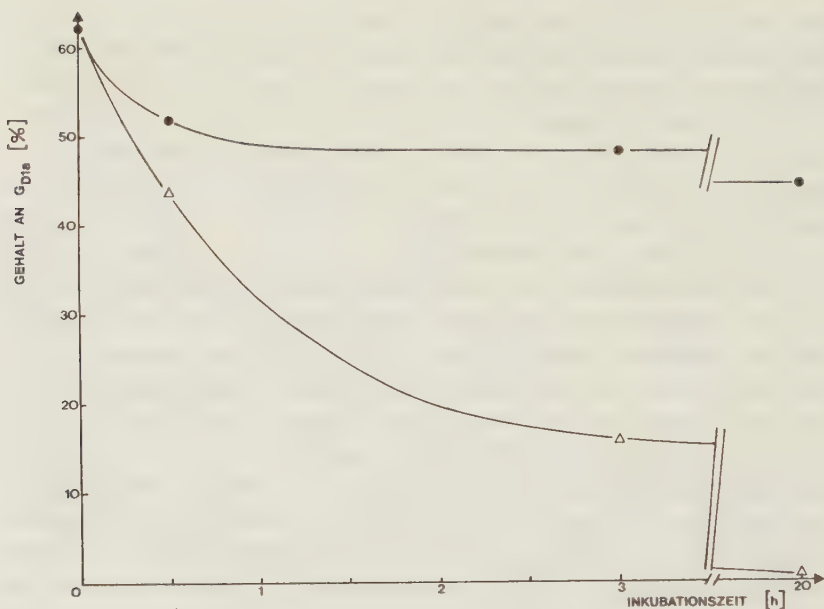


Abb. 26

Zeitabhängigkeit des Abbaus endogenen Gangliosids G_{01a} durch die membrangebundene Sialidase bei verschiedenen Ionenstärken

0.5 ml Ansatz enthielten 500 µg mikrosomales Protein (M.G, frisch präpariert), 50 mM Formiatpuffer pH 3.6 und NaCl entsprechend der angegebenen Gesamtionenstärke. Nach verschieden langer Inkubation bei 37° C wurden aus den mikrosomalen Membranen die Ganglioside isoliert und nach Dünnschichtchromatographie densitometrisch quantifiziert (s. Abschnitt 6.3.5.). Aufgetragen ist der prozentuale Anteil von Gangliosid G_{01a} am Gesamtgangliosidgehalt der mikrosomalen Membranen.

△ Ionenstärke von 23 mM

● Ionenstärke von 150 mM

das bereinigte pH-Optimum der membrangebundenen Sialidase geringfügig höher liegen dürfte. Es ist ohnehin recht breit, und selbst bei neutralen pH-Werten zeigt das Enzym noch beträchtliche Aktivität. Soweit in den Ansätzen wegen der Vergleichbarkeit mit physiologischen Verhältnissen eine Ionenstärke von 150 mM eingehalten wurde, muß mit einer merklichen Inaktivierung der Sialidase während der üblichen Inkubationszeiten gerechnet werden. Bevor nun wieder die Betrachtungen über die besondere Kinetik membrangebundener

Enzym-Substrat-Systeme fortgeführt werden, muß erst noch auf die in Zusammenhang mit dem pH-Profil der Sialidaseaktivität aufgetauchte Frage eingegangen werden, deren Beantwortung auch für die Interpretation enzymkinetischer Studien von großer Tragweite ist: Enthalten die als Enzymquelle benutzten mikrosomalen Membranen aus Kalbshirn nur eine oder aber mehrere Sialidasen ?

2.5. Untersuchungen zum Vorkommen mehrerer Sialidasen in der verwendeten Enzympräparation

Wie in der Einleitung ausgeführt, war es auf Grund ihrer membrangebundenen Natur bisher nicht gelungen, die Sialidase des Kalbshirns zu reinigen, doch konnten die sie tragenden Membranen als synaptischen Ursprungs charakterisiert werden, trotz des sauren pH-Optimums des Enzyms, das eher an eine lysosomale Herkunft hätte denken lassen. Diese allgemein anerkannten Befunde schließen aber nicht völlig aus, daß die als Enzymquelle benutzte Membranpräparation - in der vorliegenden Arbeit mikrosomale Membranen - wegen ihrer auch mit den besten Fraktionierungsmethoden nicht zu vermeidenden Heterogenität mehrere Sialidasespezies enthalten könnte, vielleicht mit unterschiedlichen Substratspezifitäten, wie für die Sialidasen in Lebermembranen beschrieben (157). Als Hinweise auf das Vorkommen zweier Sialidasen in den mikrosomalen Membranen, eine spezifisch für wasserlösliche Substrate und eine spezifisch für Ganglioside, kann man z.B. die Unterschiede im Einfluß niedriger Ca^{2+} -Konzentrationen oder membranfluidisierender Agentien (s. vorhergehenden Abschnitt, Abschnitt 2.2.1. und 2.4.1.) auf den Umsatz der beiden Substrattypen ansehen, für die immer die verschiedene Natur der Substrate verantwortlich gemacht worden war. Das eigenartige pH-Profil der Sialidaseaktivität wiederum mit seiner langen Schulter bis zu neutralen pH-Werten (Abschnitt 2.4.1.) legt die Existenz einer Sialidase mit einem pH-Optimum bei pH 3.5 bis 4 und einer zweiten Sialidase mit einem pH-Optimum zwischen pH 6 und 6.5 nahe, hier allerdings mit gleicher oder zumindest sehr ähnlicher Substratspezifität, da mit beiden Substrattypen qualitativ gleiche pH-Abhängigkeiten erzielt wurden. Abgesehen von diesem gegenseitigen Widerspruch - falls man nicht die Existenz von vier verschiedenen Sialidasen in den mikrosomalen Membranen annehmen will - liefern die bisher beschriebenen Versuche aber auch Argumente, die für nur ein Enzym

sprechen, das beide Substrate spaltet. Insbesondere die Versuche zur Stabilität der Sialidase (Kapitel 2.2.) veranschaulichen, daß eine Vorinkubation des Enzyms bei höheren Temperaturen (Abb. 6 und 8), sowie in Gegenwart von erhöhter Ionenstärke (Abb. 9 a), von Proteasen (Abb. 10 und 11) und von Detergentien (Abb. 12) den Umsatz des wasserlöslichen und des lipidlöslichen Substrats in qualitativ und oft auch quantitativ gleicher Weise herabsetzt. Die Enzymaktivitäten gegenüber beiden Substraten zeigen also bezüglich einer proteindenaturierenden Behandlung gleiche physikochemische Eigenschaften, was sehr für nur ein Protein als Träger der Aktivitäten spricht.

In den folgenden Abschnitten wird nun dem Problem des Vorkommens von möglicherweise zwei Sialidasen unterschiedlicher Substratspezifität in den mikrosomalen Membranen zum einen mit enzymkinetischen Methoden und zum andern mit einer versuchsweisen Reinigung des Enzyms weiter nachgegangen.

2.5.1. Hemmstudien mit 2-Deoxy-2,3-dehydro-NeuAc (NeuAc-2-en)

Eine Möglichkeit, Hinweise auf das Vorkommen einer oder mehrerer Sialidasen in den verwendeten mikrosomalen Membranen zu erhalten, eröffnet der Einsatz von Inhibitoren, die an das Enzym binden, selbst aber nicht umgesetzt werden können. Z.B. hatten Hemmversuche mit den potenten Sialidaseinhibitoren NeuAc-2-en und N-(4-Nitrophenyl)-oxamsäure ergeben, daß lysomale Membranen aus menschlicher Leber wenigstens zwei Sialidasen mit unterschiedlicher Substratspezifität enthalten müssen (156, Ü 35). Für solche Untersuchungen besonders geeignet schien der kompetitive Inhibitor NeuAc-2-en, der aufgrund der Doppelbindung am anomeren C-Atom planare Konfiguration aufweist (Halbsesselform) und damit als "Transition-State-Analog" der Sialidase-substrate angesehen wird (160). Katalysiert nur eine mikrosomale Sialidase den Abbau von 4-MU-NeuAc und Gangliosid G_{D1a} , so sollte er durch NeuAc-2-en auch gleichermaßen hemmbar sein, d.h. genauer gesagt, die bezüglich des Umsatzes der beiden Substrate bestimmten Inhibitionskonstanten K_I sollten identisch sein, da sie als Dissoziationskonstanten des Enzym-Inhibitor-Komplexes nicht vom benutzten Substrat abhängen.

Die in Gegenwart verschiedener Konzentrationen an NeuAc-2-en gemessenen Umsatzraten in Abhängigkeit von der jeweils eingesetzten Konzentration der beiden Sialidasesubstrate 4-MU-NeuAc und Gangliosid G_{D1a} sind in Abb. 27 und 28 in Form doppelt reziproker Diagramme nach Lineweaver und Burk (141) aufge-

tragen. Die Kurven zeigen die typischen Merkmale einer kompetitiven Hemmung, nämlich ansteigende Michaelis-Konstanten bei unveränderter Maximalgeschwindigkeit. Die Testinkubationen fanden in Anwesenheit von 0.2 % Triton X-100 statt - teilweise auch nach Vorinkubation der mikrosomalen Membranen mit diesem Detergens -, um nach Möglichkeit Verfälschungen der Abbauraten durch endogene Substrate und durch einen behinderten Gangliosideinbau in die Membranen zu vermeiden (vgl. Abschnitt 2.3.2. und 2.3.5.). Aufgrund von Vorversuchen waren die Inhibitorkonzentrationen so gewählt worden, daß jeweils eine deutliche Hemmung der betreffenden Substratspaltung gewährleistet war. Daß sich diese Konzentrationen um den Faktor 10 unterscheiden, macht bereits deutlich, wieviel stärker der Umsatz von 4-MU-NeuAc im Vergleich zu dem von Gangliosid G_{D1a} durch NeuAc-2-en gehemmt wird, doch läßt dies alleine ohne Kenntnis der kinetischen Parameter für die beiden sialidasekatalysierten Reaktionen noch keinen Schluß auf zwei Sialidasen zu. Daher wurden aus den Daten der Abb. 27 und 28 die kinetischen Konstanten K_M und V_{max} ermittelt (s. Tab.7), die nach der folgenden Gleichung eine Berechnung der Inhibitionskonstante K_I zulassen (Umformung der Gl. 9 aus Abschnitt 6.3.6.3):

$$K_I = [I] \frac{K_M}{K_{M(I)} - K_M}$$

$[I]$ = Konzentration des Inhibitors

K_M bzw. $K_{M(I)}$ = Michaelis-Konstante in Abwesenheit bzw. Anwesenheit des Inhibitors

Nach Einsetzen der Werte von Tab. 7 ergibt sich für die Hemmung des Abbaus von 4-MU-NeuAc durch NeuAc-2-en ein K_I von 3.5 μM , für die Hemmung des Abbaus von Gangliosid G_{D1a} dagegen ein K_I von 0.14 mM. Durch eine graphische Auswertung der Umsatzraten nach der Methode von Dixon (47, Auftragung des Kehrwerts der Umsatzraten gegen $[I]$, jeweils für jede Substratkonzentration) erhält man in guter Übereinstimmung entsprechende Werte von ca. 4 μM bzw. von ca. 0.13 mM. Der Unterschied in den Hemmkonstanten um den Faktor 30 fordert, daß die beiden Substrate 4-MU-NeuAc und Gangliosid G_{D1a} von zwei verschiedenen Sialidasen gespalten werden, trotz der eingangs zu diesem Kapitel dargelegten guten Argumente, die für nur ein Enzym sprechen. Wenn

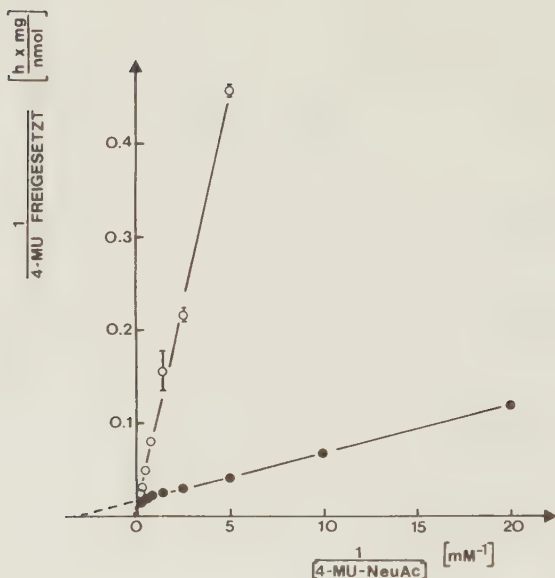


Abb. 27

Doppelt reziproke Darstellung des sialidasekatalysierten Umsatzes von 4-MU-NeuAc bei verschiedenen Konzentrationen des Substrats, in Abwesenheit und in Anwesenheit des Sialidaseinhibitors NeuAc-2-en

Mikrosomale Membranen (M.F.) wurden in Gegenwart von 1 % (w/v) Triton X-100 eine Stunde bei 37° C vorinkubiert. Die Inkubationsansätze für die anschließende Bestimmung der Sialidaseaktivität enthielten in 0.1 ml Volumen 100 µg mikrosomales Protein, verschiedene Konzentrationen an 4-MU-NeuAc, 50 mM Formiatpuffer pH 3.6 (Ionenstärke: 23 mM) und 0.2 % Triton X-100, sowie gegebenenfalls 0.05 mM NeuAc-2-en. Nach einstündiger Inkubation bei 37° C wurde der Substratumsatz fluorimetrisch ermittelt (s. Abschnitt 6.3.1.). Die Kehrwerte der Umsatzgeschwindigkeiten, jeweils Mittelwerte aus Doppelbestimmungen, sind unter Angabe der Standardabweichungen gegen die Kehrwerte der jeweiligen 4-MU-NeuAc-Konzentrationen aufgetragen.

● Ohne Inhibitor

○ Mit 0.05 mM NeuAc-2-en

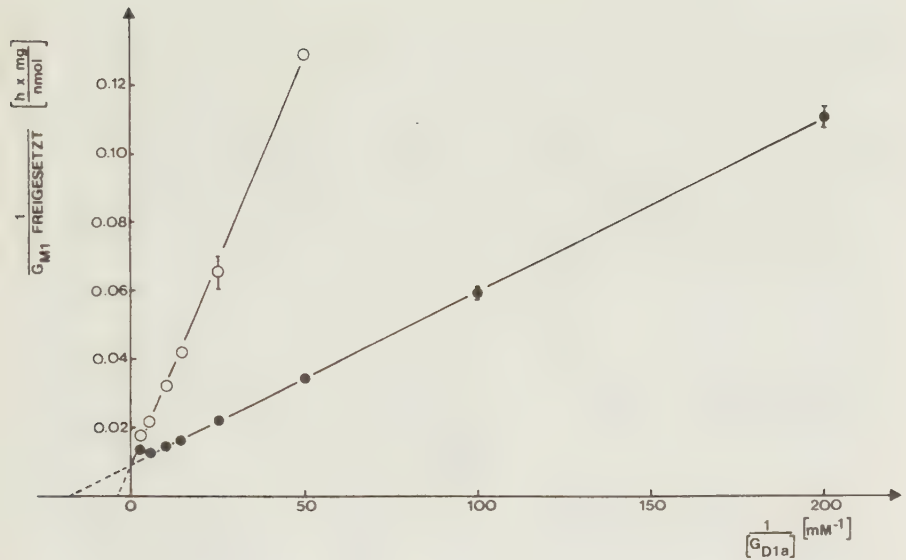


Abb. 28

Doppelt reziproke Darstellung des sialidasekatalysierten Umsatzes von Gangliosid G_{D1a} bei verschiedenen Konzentrationen des Substrats, in Abwesenheit und in Anwesenheit des Sialidaseinhibitors NeuAc-2-en

0,1 ml Ansatz enthielten 100 μg mikrosomales Protein (M.F), verschiedene Konzentrationen an $[^3\text{H}]$ -Gangliosid G_{D1a} , 50 mM Formiatpuffer pH 3,6 (23 mM Ionenstärke) und 0,2 % (w/v) Triton X-100, sowie gegebenenfalls 0,5 mM NeuAc-2-en. Nach 15-minütiger Inkubation bei 37° C wurde der Gangliosidumsatz radiometrisch ermittelt (s. Abschnitt 6.3.3.)

Die Kehrwerte der Umsatzgeschwindigkeiten, jeweils Mittelwerte aus Doppelbestimmungen, sind unter Angabe der Standardabweichungen gegen die Kehrwerte der jeweiligen Gangliosidkonzentrationen aufgetragen.

- Ohne Inhibitor
- Mit 0,5 mM NeuAc-2-en

Tab. 7

Michaelis-Konstanten K_M und Maximalgeschwindigkeiten V_{max} für den sialidasekatalysierten Umsatz von 4-MU-NeuAc und Gangliosid G_{D1a} in Gegenwart verschiedener Konzentrationen des Sialidaseinhibitors NeuAc-2-en

Aus den Daten der Abb. 27 und 28 wurden nach verschiedenen Verfahren zur Kurvenanpassung (s. Abschnitt 6.3.6.2.) die Werte für K_M und V_{max} berechnet und jeweils gemittelt. Diese Mittelwerte sind angegeben, zusammen mit der Streuung aufgrund der verschiedenen Rechenverfahren (vgl. Abschnitt 6.3.6.2.). Ausnahme: Die Umsatzraten von 4-MU-NeuAc in Gegenwart von NeuAc-2-en waren sehr niedrig und daher mit einem großen experimentellen Fehler behaftet (ungünstige Relation von Meßwert zu Blindwert). Die kinetischen Konstanten aus den einzelnen Kurvenanpassungen differierten hier um bis zu 30 %, so daß nur die Werte aus dem zuverlässigsten Rechenverfahren (Anpassung an die Michaelis-Menten-Gleichung selbst) angeführt sind.

Konzentration von NeuAc-2-en [mM]	Abbau von 4-MU-NeuAc		Abbau von Gangliosid G_{D1a}	
	K_M [mM]	V_{max} [nmol h·mg]	K_M [mM]	V_{max} [nmol h·mg]
0	0.33 ± 0.03	63 ± 2	0.045 ± 0.007	97 ± 5
0.05	5.0	67	-	-
0.5	-	-	0.21 ± 0.02	94 ± 6

dem aber so ist, dann sollten sich die beiden Substrate bei gleichzeitiger Anwesenheit im Inkubationsansatz in ihrem Abbau gegenseitig nicht beeinflussen, da ja jedes sein eigenes aktives Zentrum hat, an dem es gespalten wird. Ein diesbezüglicher Versuch ist Gegenstand des folgenden Abschnitts.

2.6.2. Gleichzeitiger Abbau von 4-MU-NeuAc und Gangliosid G_{D1a} durch die membrangebundene Sialidase

Um festzustellen, ob die beiden Sialidasesubstrate 4-MU-NeuAc und Gangliosid G_{D1a} miteinander um ein aktives Zentrum konkurrieren, oder ob sie von zwei verschiedenen membrangebundenen Sialidasen gespalten werden, wurden sie gemeinsam mit mikrosomalen Membranen inkubiert und anschließend für beide der Umsatz ermittelt. Dabei wurden die Konzentrationen beider Substrate in einem weiten Bereich variiert, ansonsten aber die gleichen Bedingungen wie bei den Versuchen des vorhergehenden Abschnitts eingehalten. In Tab. 8 sind einige der so erhaltenen Abbauraten den entsprechenden Daten aus den Abb. 27 und 28 des vorhergehenden Abschnitts für getrennt durchgeführte

Tab. 8

Umsatz der Substrate 4-MU-NeuAc und Gangliosid G_{D1a} bei getrennter und bei gemeinsamer Inkubation mit membrangebundener Sialidase

Die Umsatzgeschwindigkeiten bei getrennter Inkubation der beiden Sialidasesubstrate sind den Abbildungen 27 und 28 entnommen. Die Umsatzgeschwindigkeiten bei gemeinsamer Inkubation wurden wie folgt bestimmt: Mikrosomale Membranen (M.f) wurden in Gegenwart von 1% Triton X-100 eine Stunde bei 37° C vorinkubiert. Die Inkubationsansätze für die anschließende Bestimmung der Sialidaseaktivität enthielten in 0.1 ml Volumen 100 µg mikrosomales Protein, die angegebenen Konzentrationen an 4-MU-NeuAc und [3H]-Gangliosid G_{D1a} , 50 mM formatpuffer pH 3.6 (Ionenstärke: 23 mM) und 0.2% Triton X-100. Nach einstündiger Inkubation bei 37° C und Teilung der Ansätze wurde der Substratumsatz fluorimetrisch bzw. radiometrisch ermittelt (s. Abschnitt 6.3.1. und 6.3.3.). Die Umsatzgeschwindigkeiten, Mittelwerte aus Doppelbestimmungen, sind unter Angabe der Standardabweichungen in $\frac{\text{nmol}}{\text{h} \cdot \text{mg}}$ aufgeführt.

Für die Berechnungen wurden die kinetischen Konstanten aus Tab. 7 für die ungehemmte Reaktion in die folgenden Gleichungen eingesetzt (vgl. 48):

$$\text{Getrennter Umsatz der Substrate: } V_M = V_{\max M} \cdot \frac{[S]_M}{K_{MM} + [S]_M}$$

$$\text{bzw. } V_G = V_{\max G} \cdot \frac{[S]_G}{K_{MG} + [S]_G}$$

$$\text{Gemeinsamer Umsatz der Substrate: } V_M = \frac{V_{\max M} \cdot [S]_M}{[S]_M + K_{MM} \cdot (1 + \frac{[S]_G}{K_{MG}})}$$

$$\text{bzw. } V_G = \frac{V_{\max G} \cdot [S]_G}{[S]_G + K_{MG} \cdot (1 + \frac{[S]_M}{K_{MM}})}$$

Konzentration [nM] an		Getrennt bestimmter Umsatz von		Gemeinsam bestimmter Umsatz von			
4-MU-NeuAc	Gangl. G_{D1a}	4-MU-NeuAc	Gangl. G_{D1a}	Berechnet	4-MU-NeuAc	Gangl. G_{D1a}	Berechnet
$[S]_M$	$[S]_G$	V_M	V_G	V_M	V_M	V_G	V_G
0.2	0.07	24.3 ± 0.1	61.5 ± 3.9	23.8	7.4 ± 0.5	63.0 ± 0.8	12.1
1.2	0.04	44.4 ± 0.1	44.7 ± 1.2	49.6	30.5 ± 0.3	37.2 ± 0.1	41.6
4	0.02	58.8 ± 0.1	28.5 ± 0.4	58.4	55.5 ± 1.0	17.0 ± 0.1	56.5
1.2	0.1	44.4 ± 0.1	66.7 ± 2.5	49.6	10.1 ± 1.6	69.4 ± 1.7	33.5
4	0.07	58.8 ± 0.1	61.5 ± 3.9	58.4	34.5 ± 3.8	48.0 ± 0.1	52.2
7	0.04	62.3 ± 1.2	44.7 ± 1.2	60.4	43.0 ± 2.0	26.2 ± 0.4	58.0

Umsatzbestimmung gegenübergestellt. Man erkennt sofort, daß sich die beiden Substrate ganz eindeutig gegenseitig im Abbau behinderten, so als würden sie doch um nur ein aktives Zentrum konkurrieren, im Gegensatz zum Befund des vorhergehenden Abschnitts.

Da im vorliegenden Fall die enzymkinetischen Konstanten für die Spaltung der beiden Sialidasesubstrate bekannt sind (s. Tab. 7 des vorhergehenden Abschnitts), kann man anhand der jeweils gültigen Geschwindigkeitsgleichungen die zu erwartenden Umsatzraten für die beiden Substrate berechnen (48), sowohl für den Fall, daß sie unabhängig voneinander von zwei Sialidasen gespalten werden (es gilt für jedes Substrat die jeweilige Michaelis-Menten-Gleichung), als auch für den Fall, daß sie nur an einem katalytischen Zentrum umgesetzt werden (jedes Substrat wirkt für den Umsatz des anderen wie ein kompetitiver Inhibitor mit $K_M = K_I$). Die so berechneten Reaktionsgeschwindigkeiten sind ebenfalls in Tab. 8 aufgeführt und stimmen für ersteren Fall natürlich mit den aus den Abb. 27 und 28 übernommenen Werten überein, da die kinetischen Konstanten ja aus ihnen ermittelt wurden. Die berechneten Geschwindigkeiten für den Abbau des Substratgemisches durch nur eine Sialidase weichen hingegen deutlich von den tatsächlich in den gemeinsamen Inkubationsansätzen gemessenen Werten ab. Damit steht man vor dem widersprüchlichen Befund, daß wasserlösliches und lipidlösliches Substrat zwar miteinander konkurrieren, wie an der gegenseitigen Hemmung sichtbar wird, daß aber gleichzeitig Gangliosid G_{D1a} den Abbau von 4-MU-NeuAc stärker und 4-MU-NeuAc wiederum den Abbau von Gangliosid G_{D1a} wesentlich schwächer inhibieren, als ihren jeweiligen Affinitäten zu einem gemeinsamen aktiven Zentrum entsprechen würde.

Das gleiche ergibt sich aus einer graphischen Abschätzung der gegenseitigen Hemmkonstanten nach der Methode von Dixon (vgl. vorhergehenden Abschnitt). Betrachtet man Gangliosid G_{D1a} als Inhibitor der 4-MU-NeuAc-Spaltung, so erhält man für die scheinbare Hemmkonstante einen Wert um 0.01 mM (vgl. K_M für Gangliosid G_{D1a} von 0.045 mM), im umgekehrten Fall mit 4-MU-NeuAc als Inhibitor und Gangliosid G_{D1a} als Substrat einen Wert um 1 mM (vgl. K_M für 4-MU-NeuAc von 0.33 mM).

Diese Ergebnisse fordern, daß die mikrosomalen Membranen zwei Sialidasen enthalten, die jeweils spezifisch nur eines der beiden Substrate spalten können, aber in ihrer Aktivität vom jeweils anderen Substrat gehemmt werden. Es ergäbe sich dann folgendes Bild: Die spezifisch 4-MU-NeuAc

spaltende Sialidase ($K_M = 0.33 \text{ mM}$) bindet mit sehr hoher Affinität den kompetitiven Inhibitor NeuAc-2-en ($K_I = 0.004 \text{ mM}$) und auch Gangliosid G_{D1a} ($K_I = 0.01 \text{ mM}$), ohne letzteres aber signifikant umsetzen zu können (da kaum eine Hemmung des Gangliosidabbaus durch Konzentrationen an NeuAc-2-en, die die 4-MU-NeuAc-spezifische Sialidase nahezu vollständig inhibieren). Die spezifisch Gangliosid G_{D1a} spaltende Sialidase bindet im Vergleich dazu sowohl ihr Substrat ($K_M = 0.045 \text{ mM}$) als auch die beiden wasserlöslichen Verbindungen 4-MU-NeuAc ($K_I = 1 \text{ mM}$) und NeuAc-2-en ($K_I = 0.14 \text{ mM}$) deutlich schlechter, setzt das Gangliosid aber sehr schnell um. Und das obendrein bei gleicher Stabilität der beiden Enzyme gegenüber verschiedenen protein-denaturierenden Einflüssen und bei gleichem pH-Profil der beiden Aktivitäten (vgl. Beginn des Kapitels 2.5.).

Es wurde daher nach einer zufriedenstellenderen Erklärung gesucht und in den unterschiedlichen physikochemischen Eigenschaften der beiden Sialidasesubstrate möglicherweise auch gefunden. Sowohl Gangliosid G_{D1a} als auch 4-MU-NeuAc und NeuAc-2-en tragen negative Ladung, doch während letztere unter den oben eingehaltenen Inkubationsbedingungen frei in der wässrigen Phase gelöst bleiben, wird das Gangliosid Bestandteil der sialidasehaltigen Detergens/Lipid/Protein-Mischaggregate, die dadurch je nach Gangliosidkonzentration eine mehr oder weniger große negative Oberflächenladung erhalten. Aufgrund dessen wird ein ebenfalls negativ geladenes wasserlösliches Molekül abgestoßen und seine effektive Konzentration $[S]$ an der Oberfläche der Mischaggregate gehorcht der Gleichung (z.B. 126, Ü 76)

$$[S] = [S]_0 \cdot \exp \left(- \frac{Z \cdot e \cdot \psi}{k \cdot T} \right)$$

$[S]_0$ = freie Konzentration in der wässrigen Phase

ψ = Oberflächenpotential

T = absolute Temperatur

e = Elementarladung

Z = Anzahl der Ladungen je Molekül

k = Boltzmannkonstante

Bestimmt man nun z.B. die Hemmkonstanten für NeuAc-2-en bezüglich des Abbaus von 4-MU-NeuAc und von Gangliosid G_{D1a} , so sind die Bedingungen durchaus verschieden, unter denen jeweils die Wechselwirkung zwischen Inhibitor und Sialidase stattfindet. Konkurriert NeuAc-2-en mit 4-MU-NeuAc,

so sind die enzymtragenden Mischaggregate nur schwach oder nicht geladen, bei Konkurrenz mit Gangliosid G_{D1a} dagegen stark negativ. Dadurch sinkt die effektive Inhibitorkonzentration in der Nähe der Sialidase und die ermittelte Hemmkonstante fällt größer aus.

Ganz analog ließen sich auch die für die Werte in Tab. 8 beobachteten Abweichungen von der Ein-Enzym-Theorie erklären. Gangliosid G_{D1a} verringert, über seine Konkurrenz um das aktive Zentrum hinaus, durch Ladungsabstoßung die Konzentration von 4-MU-NeuAc in der Umgebung der Sialidase und bewirkt so eine stärkere Hemmung des 4-MU-NeuAc-Umsatzes als erwartet, während umgekehrt 4-MU-NeuAc den Gangliosidabbau weniger zu hemmen vermag, als seiner Affinität zur Sialidase eigentlich entsprechen würde.

Ganz ähnliche Befunde haben auch andere Arbeitsgruppen (167, 31, s. auch Ü 33) für den Umsatz geladener Substrate durch membrangebundene Enzyme erhoben. Bei - bezogen auf die Ladung des Substrats - gleichsinniger Aufladung der enzymtragenden Membran konnten sie eine Erhöhung der Michaelis-Konstanten K_M , bei gegensinniger Aufladung dagegen ein Absinken von K_M beobachten. Doch unterschieden sich die K_M -Werte dabei um Faktoren zwischen 2 und 10, so daß ohne Kenntnis des Oberflächenpotentials der sialidasehaltigen Aggregate, das leider einer direkten Messung kaum zugänglich ist, offen bleiben muß, ob der Faktor 30 zwischen den Hemmkonstanten für NeuAc-2-en bezüglich der 4-MU-NeuAc- bzw. der Gangliosid G_{D1a} -Spaltung allein mit Ladungsabstoßung ausreichend erklärt werden kann.

Als zusätzliche Erklärungsmöglichkeit bietet sich die von Sandhoff und Pallmann (208, 209) aufgrund von Hemmstudien mit Asialogangliosid G_{A2} geforderte, hydrophobe Bindungsstelle an der Sialidase an. Möglicherweise lagert sich das Enzym bei Besetzung der hydrophoben Bindungsstelle durch ein Gangliosidmolekül dergestalt konformativ um, daß das eigentliche aktive Zentrum für wasserlösliche Substrate oder Inhibitoren schwerer zugänglich wird. Dadurch würde ebenfalls - analog zur Argumentation bezüglich der Ladungsabstoßung - der Wettbewerb zwischen wasserlöslichen und lipidlöslichen Substraten zum Vorteil letzterer verzerrt.

Alle diese Interpretationen schwächen zwar die Aussagekraft der Hemm- und Konkurrenzversuche zugunsten der Zwei-Enzym-Theorie, sie können diese aber nicht widerlegen. Um daher unabhängig von enzymkinetischen Studien vielleicht sicherere Anhaltspunkte für die Anwesenheit nur einer oder aber mehrerer Sialidasen in den mikrosomalen Membranen zu erhalten, wurde versucht, die Sialidase(n) aus Kalbshirnmikrosomen zu reinigen.

2.5.3. Partielle Reinigung der membrangebundenen Sialidase

Nach den kinetischen Studien der beiden letzten Abschnitte erscheint es durchaus immer noch möglich, daß die mikrosomalen Membranen nicht nur eine Sialidase enthalten. Wenn dem so sein sollte, dann kann es sich aber nur um Sialidasen mit ausgeprägter Spezifität für entweder wasserlösliches oder lipidlösliches Substrat handeln. In einem solchen Fall müßten sich aber bereits durch einige wenige Anreicherungs-schritte Hinweise auf eine, wenn auch noch so geringfügige, Auftrennung der Sialidaseaktivitäten gegenüber 4-MU-NeuAc und Gangliosid G_{D1a} erhalten lassen. Wie in der Einleitung bereits erwähnt, ist bisher noch keine nennenswerte Reinigung der membrangebundenen Sialidase des Kalbshirns beschrieben worden, trotz mehrfacher Versuche, auch in unserem Arbeitskreis (175). Eines der Hauptprobleme bestand darin, die Sialidase mit geeigneten Detergentien in aktiver Form aus den mikrosomalen Membranen freizusetzen und stabil in Lösung zu halten. Eigene Vorversuche, die Sialidase ohne Detergenszusatz nur durch starke Erhöhung der Membranfluidität bei einem Lachgasdruck von 35 atm oder durch Inkubation in Gegenwart von 0.1 % Trypsin aus den mikrosomalen Membranen zu lösen, waren an ihrem festen, offenbar integralen Sitz in der Membran gescheitert (vgl. Abschnitt 2.2.4.).

Damit bot sich als einzig gangbarer Weg die Auflösung der Membranen mit Detergens und die Solubilisierung des Enzyms als Detergens/Protein-Mischmicelle an. Die Sialidase hatte sich gegenüber dem nichtionischen Detergens Triton X-100 als wesentlich stabiler erwiesen als gegenüber n-Octyl- β -D-Glucopyranosid (s. Abschnitt 2.2.5.) und so erschien ihre Extraktion aus den mikrosomalen Membranen mit hohen Tritonkonzentrationen am aussichtsreichsten (vgl. z.B. auch 157, 282). In Zusammenarbeit mit E. Acevedo aus unserem Arbeitskreis wurden, wie in Abschnitt 6.5. genauer beschrieben, Kalbshirnmikrosomen in 2.25 %-iger (w/v) Tritonlösung homogenisiert und durch Ultrazentrifugation von unlöslichen Membranbestandteilen befreit. Durch differentielle Zentrifugation der sialidasehaltigen Detergens/Lipid/Protein-Suspension in einem Saccharosegradienten wurden größere Aggregate und ein Teil der Membranlipide abgetrennt. Die dem Aktivitätspeak entsprechenden Fraktionen zwischen 14 und 21 % (w/v) Saccharose wurden vereinigt und einer isoelektrischen Fokussierung im pH-Bereich 2.5 bis 8 unterzogen. Der Säulinhalt wurde fraktioniert und auf Sialidaseaktivität gegenüber den beiden

Substraten 4-MU-NeuAc und Gangliosid G_{D1a} getestet. Die beiden in Abb. 29 dargestellten Aktivitätsprofile zeigen bis in Einzelheiten hinein völlig parallelen Verlauf, wobei der Doppelpeak sehr wahrscheinlich auf einem Artefakt infolge Ausbildung einiger Proteinflocken beruhen dürfte, die bei der Fraktionierung in Fraktion 7 gelangt sind. Der identische isoelektrische Punkt bei pH 6.0 ± 0.5 für beide Sialidaseaktivitäten schließt nahezu aus, daß wasserlösliches und lipidlösliches Substrat von zwei verschiedenen Sialidasen gespalten werden. Andernfalls müßte man neben den eingangs zu diesem Kapitel zusammengefaßten gleichen Eigenschaften gegenüber verschiedenen proteindenaturierenden Einflüssen (Temperatur, Ionenstärke, Proteasen, Detergentien und dem gleichen pH-Profil) auch noch gleiche isoelektrische Punkte für beide Sialidasen annehmen. Ein Anreicherungsfaktor für die teilgereinigte Sialidase konnte leider nicht ermittelt werden, da der Ampholin-gehalt der Fraktionen aus der Elektrofokussierung keine Proteinbestimmung zuließ und das Material für weitere Reinigungsschritte nicht ausreichte.

Zusammenfassend zu allen vorgestellten Untersuchungen über das Vorkommen mehrerer Sialidasen in den verwendeten Kalbshirnmikrosomen muß festgestellt werden, daß sich weder für nur eine noch für mehrere membrangebundene Sialidasen absolut schlüssige Beweise haben erbringen lassen. So bleiben gewisse Zweifel, ob die kinetischen Daten zur Substratspezifität und zur Inhibition durch NeuAc-2-en mit der Annahme nur einer Sialidase unter Zuhilfenahme der unterschiedlichen Substrateigenschaften (wasserlöslich versus lipidgebunden, Ladungsabstoßung, hydrophobe Bindungsstelle) wirklich völlig befriedigend zu erklären sind. Andererseits sprechen aber die biochemischen Eigenschaften (Stabilität, pH-Profil, isoelektrischer Punkt, s.o.) der Sialidaseaktivitäten gegenüber den verschiedenen Substraten sehr klar für ihre Lokalisation auf nur einem einzigen Enzymprotein. Darüber hinaus nehmen auch andere Autoren (294, 295) aufgrund ihrer Studien über den Abbau endogener Sialidasesubstrate an, daß die in synaptischen Membranen aus Kalbs- und Rattenhirn enthaltenen Ganglioside und Sialoglykoproteine von nur einer Sialidase gespalten werden. Im folgenden wird daher weiterhin davon ausgegangen, daß mikrosomale Membranen aus Kalbshirn nur eine einzige Sialidase enthalten, die sowohl Ganglioside als auch die wasserlöslichen Substrate 4-MU-NeuAc und Sialyllactit umsetzt, obwohl nicht alle Zweifel daran völlig auszuräumen sind.

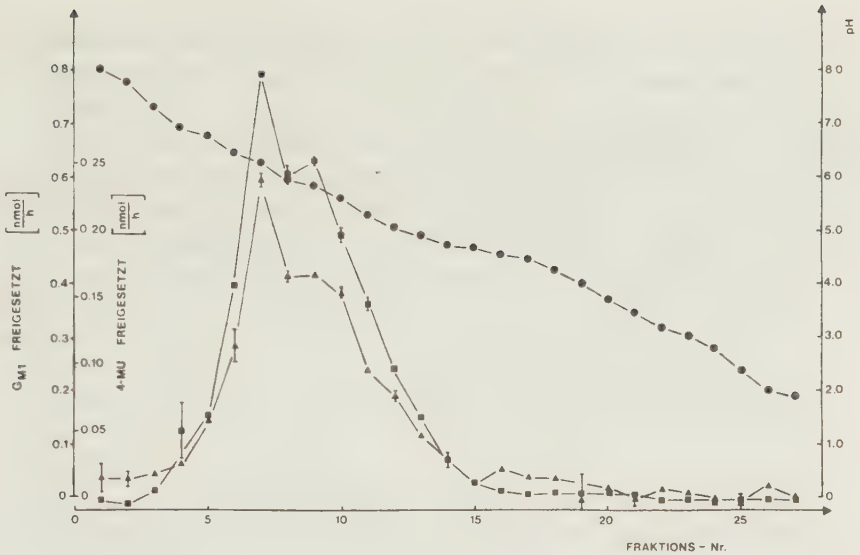


Abb. 29

Sialidaseaktivität gegenüber den Substraten 4-MU-NeuAc und Gangliosid G_{01a} in den Fraktionen aus der isoelektrischen Fokussierung solubilisierter mikrosomaler Membranen

Wie in Abschnitt 6.5. beschrieben, wurde die Sialidase aus mikrosomalen Membranen mit Triton X-100 extrahiert, durch Ultrazentrifugation weiter gereinigt und einer isoelektrischen Fokussierung unterzogen. Die nach der Fokussierung erhaltenen Fraktionen wurden auf ihren pH-Wert und ihre Sialidaseaktivität hin untersucht.

Die enzymatischen Ansätze enthielten in 0.1 ml Volumen je 20 μ l der verschiedenen Fraktionen (darin enthalten: 0.1 % Triton X-100, 0.02 % Dithioerythrit, Ampholine, Glycin, Saccharose, s. Abschnitt 6.5.3.), 0.2 mM 4-MU-NeuAc bzw. 0.1 mM [3 H]-Gangliosid G_{01a} und 150 mM Formiatpuffer pH 3.6 (Ionenstärke: 69 mM) zur Überwindung der Pufferkapazität der Ampholine. Nach einstündiger Inkubation bei 37° C wurde der Substratumsatz fluorimetrisch bzw. radiometrisch ermittelt (s. Abschnitt 6.3.1. und 6.3.3.).

Angegeben sind die Mittelwerte von Doppelbestimmungen, die Standardabweichungen sind eingezeichnet.

▲ Umsatz von 4-MU-NeuAc

■ Umsatz von Gangliosid G_{01a}

● pH-Wert der Fraktionen; es gilt die rechte Ordinatenkala

Damit ist die eingehende Behandlung der Bedingungen des enzymatischen Tests und der Versuche zur Einheitlichkeit der verwendeten Sialidasepräparation abgeschlossen, und im weiteren sollen die nach Kapitel 2.3. unterbrochenen Betrachtungen zu den Mechanismen der Wechselwirkungen zwischen der membrangebundenen Sialidase und ihren Substraten, insbesondere den Gangliosiden, wieder im Blickpunkt stehen. Dazu werden zuerst die bisher gewonnenen Ergebnisse zusammengefaßt und zu einem enzymkinetischen Modell verarbeitet, woran sich dann dessen experimentelle Überprüfung anschließt.

3. Erstellung eines kinetischen Modells für die Wechselwirkung der membrangebundenen Sialidase mit ihren Substraten

In Anknüpfung an Kapitel 2.3. läßt sich das dort bereits kurz skizzierte Modell zur Wechselwirkung der membrangebundenen Sialidase mit ihren verschiedenen Substraten wie folgt beschreiben und erweitern: Die mikrosomalen Membranen aus Kalbshirn enthalten eine fest membrangebundene Sialidase (vermutlich ein integrales Membranprotein), deren aktives Zentrum sich ein Stück oberhalb der Membranoberfläche im Bereich der Glykokalyx befindet. Wasserlösliche Substrate, wie 4-MU-NeuAc oder Sialyllactit, gelangen via Diffusion durch die wässrige Phase zum aktiven Zentrum und werden dort gemäß der klassischen Theorie zur Enzymkinetik von Michaelis und Menten (1913, 18) umgesetzt, wobei sie allerdings mit endogenen Substraten konkurrieren müssen.

Von außen den mikrosomalen Membranen in mizellarer Form zugesetzte Gangliosidsubstrate dagegen werden nur abgebaut, wenn sie sich vorher unter Auflösung der mizellaren Strukturen in die Membranen inseriert haben. Wie schon früher in unserem Arbeitskreis postuliert (1975, 208), diffundieren anschließend die Gangliosidmoleküle - wie übrigens die endogenen Substrate auch - innerhalb der Membranebene zur Sialidase und werden erst dann gespalten. Die gemessenen Geschwindigkeiten für den Umsatz exogenen Gangliosids resultieren damit aus dem Zusammenwirken dreier Größen, die je nach Inkubationsbedingungen unterschiedlich zum Tragen kommen: der Geschwindigkeit des Gangliosideinbaus in die Membranen, der Geschwindigkeit der lateralen Diffusion in der Membranebene und schließlich der wahren enzymkinetischen Parameter K_M und V_{max} der Sialidase selbst.

Im folgenden sollen nun einige Aspekte dieses Modells zur Enzymatik in Membranen herausgegriffen und näher behandelt werden, insbesondere um daraus Konsequenzen abzuleiten, die experimentell nachprüfbar sind und so weitere Hinweise auf die Tragfähigkeit des Modells geben.

3.1. Der Gangliosideinbau in die enzymhaltigen Membranen

Der dem Abbau vorgeschaltete Gangliosideinbau hat zur Folge, daß sich der eigentliche Substratspiegel in der Membran erst während der Inkubation aufbaut und im zeitlichen Mittel immer geringer ist als von der eingesetzten

Gangliosidmenge her zu erwarten. Die Kenntnis seiner Kinetik ist daher von großer Wichtigkeit für eine weitere Interpretation gemessener Umsatzraten. Über seinen Mechanismus ist leider kaum genaueres bekannt, nicht einmal für den Fall der relativ gut untersuchten Insertion in künstliche Lipidvesikel (z.B. 259, 26, 55). Mehrere Wege sind denkbar:

- 1) Mizellares Gangliosid steht im Gleichgewicht mit monomer gelöstem Gangliosid, welches sich direkt in die Membranen einlagert. Im Zusammenhang mit den beobachteten, z.T. recht hohen Einbauraten spricht allerdings die niedrige kritische Mizellkonzentration (vgl. Einleitung) und die große kinetische Stabilität von Gangliosidmizellen (57) gegen einen solchen Mechanismus.
- 2) Die Gangliosidmizellen vereinigen sich in einer Art Fusionsprozeß mit den Membranen (259, 26).
- 3) Die Gangliosidmizellen adsorbieren an die Membranen, woran sich entweder wieder eine Fusion oder ein schnelles Überwechseln einzelner Gangliosidmoleküle aus der thermodynamisch ungünstigeren mizellaren Struktur in den Membranverband anschließt.

Der letztgenannte Mechanismus erscheint besonders passend für den Einbau in natürliche Membranen, deren Oberflächenproteine gute Bindungsstellen abgeben und für die eine rasche, durch Proteolyse wieder aufhebbare Adsorption von Gangliosidmizellen mehrfach gezeigt worden war (vgl. Abschnitt 2.3.5.1.). Leider sind solche Mechanismen einer experimentellen Klärung kaum zugänglich, insbesondere im Fall der kompliziert aufgebauten biologischen Membranen. Die eigenen Untersuchungen waren daher beschränkt auf die Messung von Einbaukinetiken unter verschiedenen Bedingungen, von denen ein Einfluß auf die Membran- und/oder Mizellstruktur und damit auch auf die Insertionsgeschwindigkeit zu erwarten war (z.B. Ionenmilieu, lipidlösliche Agentien).

3.2. Die Membran als Reaktionsraum

Nach erfolgtem Einbau stellt für Gangliosid G_{D1a} nicht das wässrige Ansatzvolumen, wie bei den wasserlöslichen Substraten, sondern die Membranoberfläche den Raum dar, in dem die enzymatische Reaktion stattfindet. Die eigentlich relevante Gangliosidkonzentration in der Membran ist wegen deren geringem Volumen wesentlich höher als die üblicherweise auf das An-

satzvolumen bezogene Konzentration angibt. Außerdem hängt sie nicht vom Ansatzvolumen ab, sondern nur vom Verhältnis der eingesetzten Gangliosidmenge zur Membranmenge. Für den üblichen Ansatz mit 100 µg mikrosomalem Protein in 100 µl Ansatzvolumen läßt sie sich überschlagsmäßig berechnen. Der Lipidgehalt der Membranen beträgt etwa 1 mg je mg Protein (vgl. 17), und eine Lipiddoppelschicht hat eine Dichte von etwa 1 $\frac{\text{g}}{\text{ml}}$ (vgl. 177). Den 100 µg mikrosomalen Proteins entspricht damit ein Membranlipidvolumen von ca. 0.1 µl, also ein Tausendstel des wässrigen Ansatzvolumens. Dieser Faktor Tausend mag etwas zu hoch gegriffen sein, da man sicherlich noch einen Teil der wässrigen Grenzschicht an der Membranoberfläche und vielleicht auch noch einen Beitrag der Membranproteine zum wirklichen Reaktionsraum hinzurechnen muß, doch wird er trotzdem zumindest über Hundert liegen. Diese relativ zum wasserlöslichen Substrat enorme Konzentrierung wird allerdings durch die stark erschwerte Diffusion zur Sialidase teilweise wieder ausgeglichen (vgl. Abschnitt 3.4.). Solche Betrachtungen zum unterschiedlichen Reaktionsraum für wasserlösliches und lipidlösliches Sialidasesubstrat sind für die Interpretation kinetischer Daten sehr interessant und haben auch eine praktisch sehr leicht nachprüfbare Konsequenz: Verdünnt man einen Inkubationsansatz mit Inkubationspuffer, so sinkt die Konzentration eines zuvor zugesetzten wasserlöslichen Substrats und damit auch die Geschwindigkeit seines enzymatischen Abbaus. Die relevante Konzentration eines Gangliosidsubstrats in der Membran dagegen sollte nach erfolgtem Einbau von einer Erhöhung des wässrigen Ansatzvolumens völlig unberührt bleiben und damit auch die Geschwindigkeit seiner Spaltung.

3.3. Die Verknüpfung zwischen Enzymmenge und Reaktionsvolumen

Der Umstand, daß die sialidasehaltigen mikrosomalen Membranen gleichzeitig auch den Reaktionsraum für die Umsetzung des Gangliosidsubstrats darstellen, macht es unmöglich, die eingesetzte Enzymmenge zu ändern, ohne daß sich gleichzeitig auch im selben Ausmaß das für die enzymatische Reaktion relevante Volumen ändert. Im Fall wasserlöslicher Substrate ist dies ohne Komplikationen möglich, und man erhält für die enzymkatalysierte Reaktion:



gemäß der klassischen Michaelis-Menten-Gleichung (155, 18)

$$v = v_{\max} \frac{[S]}{K_M + [S]} = k_2 [E] \frac{[S]}{K_M + [S]} \quad (\text{Gl. 1})$$

bei konstanter Substratkonzentration $[S]$ eine lineare Abhängigkeit der Umsatzgeschwindigkeit v von der eingesetzten Konzentration $[E]$ an Enzym. (Anmerkung: Mit "v" sind, im Unterschied zu "V", die nicht auf die eingesetzte Proteinmenge bezogenen Umsatzraten bezeichnet, also z.B. $\frac{\text{nmol}}{\text{h}}$; K_M = Michaelis-Konstante; $v_{\max}$ = maximale Reaktionsgeschwindigkeit bei Substratsättigung.) Im Fall des Gangliosidsubstrats jedoch wird bei einer Erhöhung der Menge an eingesetzten mikrosomalen Membranen nicht nur die Enzymkonzentration im Ansatz von $[E]_1$ auf $[E]_2$ vergrößert, sondern zugleich auch proportional dazu das Membranvolumen. War die für den Umsatz relevante Gangliosidkonzentration in der Membran - unter der Annahme eines jeweils vollständigen Einbaus des angebotenen Gangliosids - bei der Enzymkonzentration $[E]_1$ mit irgendeinem Faktor proportional zur eingesetzten, auf das wässrige Ansatzvolumen bezogenen Konzentration $[S]$, so ist sie bei der Enzymkonzentration $[E]_2$ proportional zu $[S] \frac{[E]_1}{[E]_2}$ und Gleichung 1 wird zu

$$v = k_2 [E]_2 \frac{[S] \cdot \frac{[E]_1}{[E]_2}}{K_{M1} + [S] \frac{[E]_1}{[E]_2}} \quad (\text{Gl. 2})$$

Betrachtet man nun $[E]_2$ als eine variable Enzymkonzentration und $[E]_1$ lediglich als willkürlich gewählte Bezugsgröße, dann läßt sich für die Abhängigkeit des Gangliosidumsatzes von der eingesetzten Proteinmenge ein nicht linearer Verlauf vorhersagen. Bei sehr kleinen Enzymkonzentrationen ($[E]_2 \ll [E]_1$) kann man K_{M1} im Nenner vernachlässigen und v steigt linear mit $[E]_2$ an. Für sehr große Enzymkonzentrationen dagegen ($[E]_2 \gg [E]_1$) verschwindet der Bruch im Nenner und v geht gegen den Grenzwert

$$k_2 [E]_1 \frac{[S]}{K_{M1}}.$$

Neben einer nicht linearen Proteinabhängigkeit läßt sich aus Gl. 2 noch eine weitere Konsequenz ableiten. Nach leichter Umformung erhält sie die Gestalt

$$v = k_2 [E]_2 \frac{[S]}{K_{M1} \frac{[E]_2}{[E]_1} + [S]} \quad (Gl. 3)$$

oder

$$v = k_2 [E]_2 \frac{[S]}{K_{M2} + [S]} \quad (Gl. 4)$$

mit

$$K_{M2} = K_{M1} \frac{[E]_2}{[E]_1} \quad (Gl. 5)$$

bzw.

$$\frac{K_{M1}}{[E]_1} = \frac{K_{M2}}{[E]_2} = K'_M \quad (Gl. 6)$$

In Worten ausgedrückt besagen diese Gleichungen: Ermittelt man bei verschiedenen Enzymkonzentrationen durch jeweilige Variation der Gangliosidkonzentration die scheinbaren Michaelis-Konstanten, so sollten diese proportional zur jeweils eingesetzten Enzymmenge zunehmen, und nur der auf die jeweilige Proteinmenge bezogene K'_M -Wert K'_M sollte eine Konstante sein.

An dieser Stelle sei noch erwähnt, daß mir nach Ableitung dieser Zusammenhänge eine Veröffentlichung von Parry et. al. (177) zur Kenntnis gelangte, die die Kinetik der Wechselwirkung membrangebundener Enzyme mit Substraten behandelt, die sich zwischen wässriger Phase und Lipidphase verteilen. Die Anwendung der dort abgeleiteten Gleichungen auf den Fall, daß nur das membrangebundene Substrat abgebaut werden kann, liefert als Grenzwert für ein Streben des Membran/Wasser-Verteilungskoeffizienten gegen Unendlich Resultate, die mit obigen sinngemäß identisch sind.

3.4. Die Verknüpfung zwischen Membranviskosität und Reaktionsgeschwindigkeit

Dem zu Beginn des Kapitels skizzierten Modell entsprechend gelangen wasserlösliche Substrate über die wässrige Phase zur Sialidase, die lipid-löslichen Substrate dagegen durch Diffusion in der Membranebene. Die Geschwindigkeit dieser Diffusion bestimmt, wie häufig sich eingebautes Gangliosid und Sialidase in der Membran begegnen, bevor aufgrund der katalytischen Eigenschaften des Enzyms selbst schließlich die Spaltung erfolgen kann. Die laterale Diffusion in Membranen geht sehr viel langsamer vor sich als in wässrigen Lösungen, da die Viskosität von Membranen (1 - 10 Poise, vgl. z.B. Ü 238, 208) etwa zwei Zehnerpotenzen über der von Wasser liegt (0.01 Poise bei 20° C). So liegen die Diffusionskoeffizienten für Ionen, Zucker, Fettsäuren, etc. in wässriger Lösung im Bereich von 10^{-5} bis $10^{-6} \frac{\text{cm}^2}{\text{sec}}$ (40, 5), für Lipide und Ganglioside in Membranen dagegen bei 10^{-8} bis $10^{-10} \frac{\text{cm}^2}{\text{sec}}$ (221, 53, 245).

Niedermolekulare lipophile Substanzen wie Lachgas, Äther, Alkohole und andere Anästhetika können jedoch die Membranviskosität erniedrigen, indem sie sich in das Membraninnere einlagern und die regelmäßige Packung der Fettsäurereste der Membranlipide stören (z.B. 103, 299, 115, Ü 101). Bereits in früheren Arbeiten aus unserem Arbeitskreis wurde die mit einer solchen Membranfluidisierung einhergehende Steigerung des Umsatzes von Sphingomyelin durch die membrangebundene Sphingomyelinase (180) und von Gangliosid G_{D1a} durch die membrangebundene Sialidase (175, 208) als Folge einer erleichterten Lateraldiffusion des jeweiligen Substrats zum Enzym zu erklären versucht. (Im Sprachgebrauch wird immer das Substrat als beweglich und das Enzym als ruhend betrachtet, obwohl natürlich Proteine in der Membranebene ebenfalls diffundieren können, wenn auch in der Regel mit einem um ein bis zwei Zehnerpotenzen kleineren Diffusionskoeffizienten; z.B. 53, 43, 6, 219, 220, 221, Ü 102). Der physikalisch-mathematisch exakte Zusammenhang zwischen der Membranviskosität und der Geschwindigkeit von Reaktionen in der Membranebene ist aber nicht bekannt, da sich die Diffusionsgleichung für den zweidimensionalen Fall nicht lösen läßt. Es wurden lediglich von mehreren Autoren unter der Annahme verschiedener Randbedingungen Näherungslösungen ausgearbeitet, die folgende Aussagen zulassen (203, 73, vgl. auch 71): Die Geschwindigkeitskonstante k einer bimolekularen Reaktion ist proportional zum relativen Diffusionskoeffizienten der beiden Reaktionspart-

ner. In einer idealisierten Membran im flüssigkristallinen Zustand ist der relative Diffusionskoeffizient D wiederum - zumindest in erster Näherung - umgekehrt proportional zur Membranviskosität η . Die einzige bimolekulare Geschwindigkeitskonstante, die in die Ableitung der Michaelis-Menten-Gleichung eingeht, ist nun k_1 für die Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes (s. Reaktionsschema zu Beginn des vorhergehenden Abschnitts). Für sie gilt nach dem Gesagten:

$$k_1 \sim D \sim \frac{1}{\eta}$$

Demnach sollte ein Absinken der Membranviskosität mit Hilfe niedermolekularer, lipidlöslicher Agentien zu einer proportionalen Erhöhung von k_1 führen und so den Umsatz von Gangliosid durch die membrangebundene Sialidase beschleunigen.

Da die Michaelis-Konstante definiert ist als

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

folgt weiterhin

$$\frac{1}{K_M} \sim D \sim \frac{1}{\eta}$$

so daß mit abnehmender Membranviskosität proportional dazu K_M ebenfalls absinken sollte.

Im folgenden Kapitel werden nun die kinetischen Besonderheiten des von der membrangebundenen Sialidase katalysierten Gangliosidabbaus - angefangen mit dem Einbau des Gangliosids in die enzymhaltigen Membranen - experimentell untersucht und die aus dem Modell abgeleiteten Konsequenzen mit der Realität verglichen. Als Maßstab dafür, inwieweit sich unter den verschiedenen Versuchsbedingungen die katalytischen Eigenschaften des Enzymproteins selbst verändern, wurde jeweils der Umsatz des wasserlöslichen Substrats 4-MU-NeuAc herangezogen, der ja der klassischen Theorie zur Enzymkinetik folgen sollte.

4. Experimentelle Überprüfung des vorgeschlagenen Modells

4.1. Beeinflussung des Umsatzes von Gangliosid G_{D1a} durch die Geschwindigkeit seines Einbaus in die sialidasehaltigen Membranen

In diesem Abschnitt sollen Antworten auf folgende Fragen gefunden werden: Wie schnell baut zugesetztes $[^3H]$ -Gangliosid G_{D1a} in mikrosomale Membranen ein? In welcher Beziehung stehen Einbaugeschwindigkeit und Abbaugeschwindigkeit zueinander? Sind die Membranen mit Gangliosid absättigbar? Welchen Einfluß haben die Inkubationsbedingungen, wie pH-Wert und Ionenstärke, sowie die Membranviskosität auf die Einbaurrate? Die experimentellen Methoden, mit denen diese Fragen angegangen wurden, sind bereits aus Abschnitt 2.3.5. bekannt, und manche der angeschnittenen Fragen wurden auch schon teilweise beantwortet: Der Gangliosideinbau erfolgte am schnellsten bei pH 2.5, fiel mit zunehmendem pH-Wert rasch ab und behielt zwischen pH 5 und 9 einen konstant niedrigen Wert bei (Abschnitt 2.4.1.). Mit steigender Ionenstärke sank die Insertionsgeschwindigkeit im beobachteten Bereich bis 0.5 M deutlich und kontinuierlich ab (Abschnitt 2.4.3.).

Alle diese Studien wurden bei gleichbleibender Inkubationszeit durchgeführt. Abb. 30 zeigt nun die Zunahme des in die Membran fest eingebauten, d.h. mit Trypsinbehandlung nicht mehr ablösbaren, Gesamtgangliosids sowie des enzymatisch freigesetzten Reaktionsprodukts, Gangliosid G_{M1} , mit steigender Inkubationszeit unter drei häufig benutzten Bedingungen: physiologische Ionenstärke, niedrige Ionenstärke und erhöhte Membranfluidität. Stellvertretend für die vielen membranfluidisierenden Agentien wurde dabei n-Hexanol eingesetzt. Die Insertion ging am langsamsten bei physiologischer Ionenstärke vor sich und wurde durch ein Absenken sowohl der Ionenstärke als auch der Membranviskosität stark beschleunigt. Genau der gleichen Abstufung folgten die Abbauraten, jedoch fielen hier die relativen Unterschiede deutlich größer aus. Bei niedriger Ionenstärke als auch bei hoher Membranfluidität konnte das gesamte, angebotene Gangliosid in die mikrosomalen Membranen eingebaut und in Gegenwart von 24 mM Hexanol binnen zwei Stunden sogar vollständig zu Gangliosid G_{M1} gespalten werden.

Inwieweit dies auch unter physiologischer Ionenstärke zutrifft, sollte eine Beobachtung des Einbaus über einen längeren Zeitraum hinweg klären. Nach Ablauf der jeweiligen Inkubationszeit wurde ein Ansatzaliquot weitere

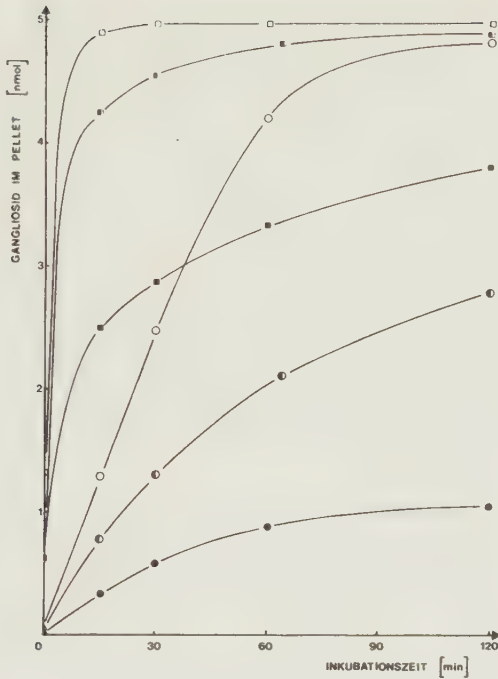


Abb. 30

Gehalt mikrosomaler Membranen an $[^3\text{H}]$ -Gangliosid G_{D1a} und G_{M1} in Abhängigkeit von der Dauer der Inkubation mit zellulären $[^3\text{H}]$ -Gangliosid G_{D1a} mit Membrangebundener Sialidase unter verschiedenen Inkubationsbedingungen

1.1 ml Ansatz enthielten 1.1 mg mikrosomales Protein (M.F.), 0.05 mM $[^3\text{H}]$ -Gangliosid G_{D1a} , 50 mM Formiatpuffer pH 3.6 (Ionenstärke 23 mM), sowie gegebenenfalls NaCl entsprechend einer Endionenstärke von 150 mM und 24 mM n-Hexanol (zugegeben in Form der gesättigten wässrigen Lösung der Konzentration 61 mM). Nach den angegebenen Zeiten der Inkubation bei 37° C wurde dem Ansatz jeweils ein Aliquot von 100 μl (Gangliosidgehalt: 5 nmol) entnommen und neutralisiert. Nach halbstündiger Inkubation bei 37° C in Gegenwart von 0.25 % Trypsin wurden die mikrosomalen Membranen abzentrifugiert und ihr Gehalt an $[^3\text{H}]$ -Gangliosid G_{D1a} und G_{M1} radiometrisch ermittelt (zur genauen Durchführung s. Abschnitt 6.4.1.).

- | | | |
|-------------------------------------|--|--|
| ■ Gesamtgangliosid | | Inkubation bei einer Ionenstärke von 150 mM |
| ● Gangliosid G_{M1} | | |
| ■ Gesamtgangliosid | | Inkubation bei einer Ionenstärke von 23 mM |
| ● Gangliosid G_{M1} | | |
| □ Gesamtgangliosid | | Inkubation bei einer Ionenstärke von 150 mM in Gegenwart von 24 mM n-Hexanol |
| ○ Gangliosid G_{M1} | | |

30 min in Gegenwart von 24 mM Hexanol inkubiert, um zum Vergleich die entsprechenden Werte bei hoher Einbaugeschwindigkeit zu erhalten. Wie aus Abb. 31 ersichtlich, konnte auch bei einer Ionenstärke von 150 mM alles angebotene Gangliosid von den mikrosomalen Membranen aufgenommen werden, wenn auch erst nach mehr als zehn Stunden. Während der halbstündigen Nachinkubation in Gegenwart von Hexanol fand ähnlich wie in Abb. 30 wieder vollständige Insertion statt, unabhängig von der Dauer der vorausgegangenen Inkubation. Eine Sättigung der mikrosomalen Membranen konnte damit auch bei einem Gangliosidangebot von 0.1 μmol je mg mikrosomalem Protein und physiologischer Ionenstärke nicht beobachtet werden. Der Gangliosidabbau hingegen kam nach etwa vier Stunden zum Erliegen, obwohl erst ca. 30 % des Gangliosids zu Gangliosid G_{M1} umgesetzt worden waren. Auch die Nachinkubation bei erhöhter Membranfluidität führte nach dieser Zeit zu keiner Umsatzsteigerung mehr, was auf eine Inaktivierung der Sialidase schließen läßt und die Resultate von Abschnitt 2.2.3. und 2.4.3. bestätigt.

In Hinblick auf die Beeinflussung der Abbauraten durch den Einbau des Gangliosids G_{D1a} in die sialidasehaltigen Membranen folgt aus den bisherigen Versuchsergebnissen: Die Geschwindigkeiten für Einbau und Abbau sind unter allen untersuchten Bedingungen von ähnlicher Größenordnung, erstere aber wenigstens um den Faktor 3 höher. Während der normalerweise eingehaltenen Inkubationszeit von 30 oder 60 min kommt der Gangliosideinbau nur bei niedriger Ionenstärke oder erhöhter Membranfluidität zum Abschluß, nicht dagegen unter Standardbedingungen (150 mM Ionenstärke). Damit dürften insbesondere die für den letztgenannten Fall ermittelten Umsatzraten von einer deutlichen Verfälschung betroffen sein, da der membrangebundenen Sialidase während der Inkubation nur ein Teil des zugesetzten Gangliosidsubstrats zur Verfügung stand.

Das läßt sich besonders anschaulich zeigen, wenn man den Gangliosideinbau und -abbau für steigende Mengen an angebotenem Gangliosid bestimmt. In Abb. 32 ist das enzymatisch freigesetzte, ja immer membrangebundene Gangliosid G_{M1} gegen den Gesamtgangliosidgehalt der mikrosomalen Membranen aufgetragen, wie es einer echten Substratabhängigkeit entspricht. Alle Abbauwerte, die bei einem Angebot von 10 nmol je 100 μg mikrosomalem Protein gemessen wurden, sind mit einem * gekennzeichnet, während die Abbauwerte für einen der Sialidase tatsächlich zur Verfügung stehenden Gangliosidgehalt der mikrosomalen Membranen von 10 nmol je 100 μg mikrosomalem Protein durch die Schnittpunkte

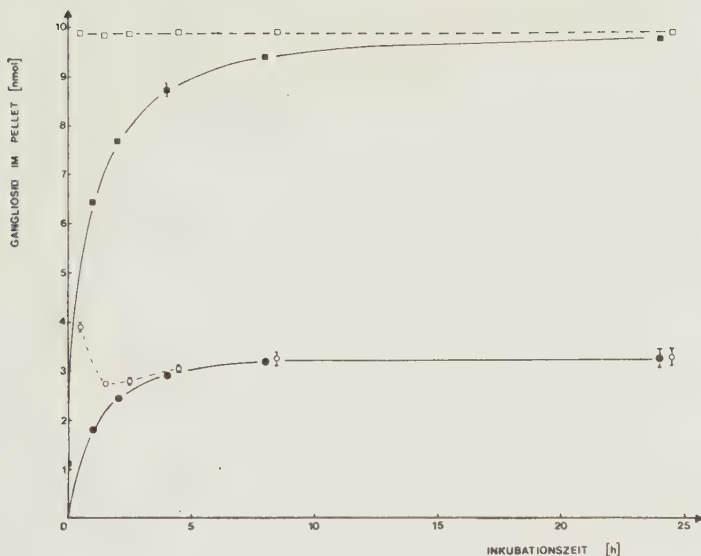


Abb. 31

Gehalt mikrosomaler Membranen an $[^3\text{H}]$ -Gangliosid G_{D1a} und G_{M1} in Abhängigkeit von der Dauer der Inkubation mikrellaren $[^3\text{H}]$ -Gangliosids G_{D1a} mit Membrangebundener Sialidase bei physiologischer Ionenstärke

1.3 ml Ansatz enthielten 1.3 mg mikrosomales Protein (M.F.), 0.1 mM $[^3\text{H}]$ -Gangliosid G_{D1a} , 50 mM Formiatpuffer pH 3.6 und NaCl entsprechend einer Endionenstärke von 150 mM. Nach den angegebenen Zeiten der Inkubation bei 37° C wurden dem Ansatz jeweils zwei Aliquots zu 100 μl (Gangliosidgehalt: 10 nmol) entnommen. Ein Aliquot wurde sofort neutralisiert, 30 min bei 37° C in Gegenwart von 0.25 % Trypsin inkubiert und nach Zentrifugation der Gehalt der mikrosomalen Membranen an $[^3\text{H}]$ -Gangliosid G_{D1a} und G_{M1} radiometrisch ermittelt (zur genauen Durchführung s. Abschnitt 6.4.1.). Das andere Aliquot wurde unter Verdoppelung seines Volumens mit einer gesättigten wässrigen Hexanolösung (61 mM) auf eine Hexanolkonzentration von 24 mM gebracht und unter Belassung der halben Puffer- und Ionenstärke weitere 30 min bei 37° C inkubiert. Anschließend wurde auch dieses Aliquot neutralisiert, mit der gleichen Menge Trypsin (d.h. mit halber Konzentration) behandelt und dann der Gangliosidgehalt der mikrosomalen Membranen ermittelt. Vom Gehalt an Gangliosid G_{M1} wurde jeweils der mit hitzeinaktivierten (10 min 100° C) mikrosomalen Membranen erhaltene Nullwert abgezogen (die nichtenzymatische Gangliosidhydrolyse betrug 0.25 % je Stunde).

- | | | |
|-------------------------------------|--|--|
| ■ Gesamtgangliosid | | Ohne Nachinkubation |
| ● Gangliosid G_{M1} | | |
| □ Gesamtgangliosid | | Mit Nachinkubation in Gegenwart von 24mM n-Hexanol |
| ○ Gangliosid G_{M1} | | |

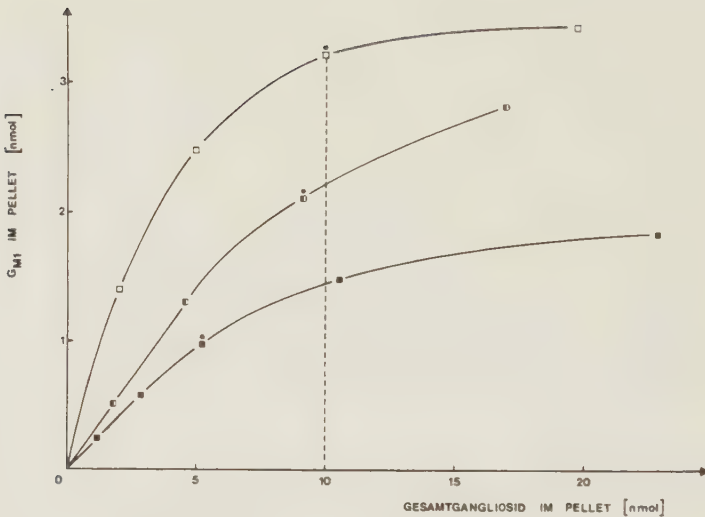


Abb. 32

Gehalt mikrosomaler Membranen an $[^3\text{H}]$ -Gangliosid $\text{G}_{\text{M}1}$ in Abhängigkeit von ihrem Gesamtgehalt an $[^3\text{H}]$ -Gangliosid nach Inkubation verschiedener Mengen an mikellarem $[^3\text{H}]$ -Gangliosid $\text{G}_{\text{D}1\text{a}}$ mit membrangebundener Sialidase unter verschiedenen Bedingungen

1.1 ml Ansatz enthielten 1.1 mg mikrosomales Protein (M.F), 0.02 bzw. 0.05 bzw. 0.1 bzw. 0.2 bzw. in einem Fall auch 0.5 mM $[^3\text{H}]$ -Gangliosid $\text{G}_{\text{D}1\text{a}}$, 50 mM Formiatpuffer pH 3.6 (Ionenstärke: 23 mM), sowie gegebenenfalls NaCl entsprechend einer Endionenstärke von 150 mM und 24 mM n-Hexanol (zugesezt in Form der gesättigten wässrigen Lösung der Konzentration 61 mM). Nach halbstündiger Inkubation bei 37° C wurde dem Ansatz ein Aliquot zu 100 μl (Gangliosidgehalt: 2 bzw. 5 bzw. 10 bzw. 20 bzw. in einem Fall auch 50 nmol) entnommen und neutralisiert. Nach halbstündiger Inkubation bei 37° C in Gegenwart von 0.25 % Trypsin wurden die mikrosomalen Membranen abzentrifugiert und ihr Gehalt an $[^3\text{H}]$ -Gangliosid $\text{G}_{\text{D}1\text{a}}$ und $\text{G}_{\text{M}1}$ radiometrisch ermittelt (zur genauen Durchführung s. Abschnitt 6.4.1.).

■ Inkubation bei einer Ionenstärke von 150 mM

◐ Inkubation bei einer Ionenstärke von 23 mM

□ Inkubation bei einer Ionenstärke von 150 mM in Gegenwart von 24 mM n-Hexanol

der gestrichelten Linie mit den einzelnen Kurven markiert werden. Bei Standardinkubationsbedingungen differieren beide Werte in Relation zu ihrer Größe ganz erheblich (um ca. 50 %), bei geringer Ionenstärke oder erhöhter Membranfluidität dagegen fallen die Unterschiede kaum ins Gewicht. Daran zeigt sich einerseits, daß der Einfluß der Ionenstärke und der Membranviskosität auf den Gangliosidumsatz ohne Berücksichtigung der unterschiedlichen Einbaugeschwindigkeiten überbewertet wird, andererseits aber auch, daß sich dieser Einfluß nicht nur allein auf den Einbau, sondern auch auf die Lateraldiffusion und/oder die katalytischen Eigenschaften der Sialidase selbst auswirkt, da andernfalls die drei Kurven näherungsweise aufeinanderfallen müßten.

Berechnet man aus den Daten die enzymkinetischen Parameter K_M und V_{max} unter Zugrundelegung einmal des Gangliosidgehalts im Ansatz und das andere Mal des Gangliosidgehalts der mikrosomalen Membranen (Tab. 9), so bringt - in Übereinstimmung mit dem bereits Gesagten - eine Berücksichtigung des Gangliosideinbaus lediglich unter Standardinkubationsbedingungen eine signifikante Korrektur des K_M -Werts nach unten mit sich, ohne aber den Unterschied infolge einer erniedrigten Membranviskosität aufzuheben. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit V_{max} , die sich auf eine Sättigung der Sialidase mit Gangliosid bezieht, wird von einer Berücksichtigung des Substrateinbaus erwartungsgemäß nicht berührt. Ihr kleinerer Wert in Gegenwart physiologischer Ionenstärke dürfte auf die teilweise Inaktivierung der Sialidase während der Inkubation zurückgehen (vgl. Abb. 31), da sie ja gemäß $V_{max} = k_2[E]$ der Konzentration an aktivem Enzym proportional ist. Damit sieht es so aus, als ließe sich die in Abschnitt 2.4.3. festgestellte Hemmung des Gangliosidumsatzes mit steigender Ionenstärke als Zusammenspiel einer Sialidasedenaturierung mit einem erschwerten Gangliosideinbau in die enzymhaltigen Membranen erklären.

Demgegenüber erfährt die Beschleunigung des Gangliosidumsatzes bei einem Absenken der Membranviskosität durch den ebenfalls beschleunigten Gangliosideinbau lediglich eine Verschärfung, die Hauptursache muß aber woanders liegen. Bevor jedoch über den Einfluß der Membranviskosität eingehender berichtet wird, sollen erst entsprechend der Reihenfolge des vorhergehenden Kapitels über die Modellvorstellungen zum Gangliosidabbau durch die membran-gebundene Sialidase die aus dem Reaktionsraum "Membran" abgeleiteten Konsequenzen experimentell überprüft werden.

Tab. 9

Michaelis-Konstanten K_M und Maximalgeschwindigkeiten V_{max} für den sialidasekatalysierten Umsatz von Gangliosid G_{D1a} unter verschiedenen Inkubationsbedingungen, ohne und mit Berücksichtigung des Gangliosideinbaus in die mikrosomalen Membranen.

Aus den Daten der Abb. 32 wurden nach verschiedenen Verfahren zur Kurvenanpassung (s. Abschnitt 6.3.6.) die Werte für K_M und V_{max} berechnet und gemittelt. Als Substratkonzentrationen wurden das eine Mal die eingesetzten Mengen an Gangliosid, dividiert durch das Ansatzvolumen, und das andere Mal die in die mikrosomalen Membranen eingebauten Mengen an Gangliosid, ebenfalls dividiert durch das Ansatzvolumen, verwendet. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte für K_M und V_{max} , zusammen mit ihrer Streuung aufgrund der verschiedenen Rechenverfahren (vgl. Abschnitt 6.3.6.).

Inkubationsbedingungen	alles angebotene Gangliosid als Substrat betrachtet		nur das eingebaute Gangliosid als Substrat betrachtet	
	K_M	V_{max}	K_M	V_{max}
	[mM]	$\left[\frac{\text{nmol}}{\text{h} \cdot \text{mg}}\right]$	[mM]	$\left[\frac{\text{nmol}}{\text{h} \cdot \text{mg}}\right]$
150 mM Ionenstärke	0.20 ± 0.02	58 ± 2	0.12 ± 0.02	60 ± 4
23 mM Ionenstärke	0.115 ± 0.015	85 ± 3	0.105 ± 0.015	84 ± 3
150 mM Ionenstärke und 24 mM n-Hexanol	0.040 ± 0.006	87 ± 6	0.038 ± 0.006	84 ± 6

4.2. Unabhängigkeit des Gangliosidumsatzes durch die membrangebundene Sialidase vom Ansatzvolumen

Gemäß dem vorgeschlagenen Modell findet der sialidasekatalysierte Gangliosidumsatz innerhalb der mikrosomalen Membranen statt. Als augenfälligste Konsequenz ergibt sich daraus nach Abschnitt 3.2., daß nach erfolgtem Gangliosideinbau ein Verdünnen des Ansatzes mit Inkubationspuffer die relevante Konzentration des Gangliosids in den Membranen nicht mehr verändern sollte, und damit auch nicht die Geschwindigkeit seines Umsatzes. Um die Gültigkeit dieser Hypothese zu klären, wurden mikrosomale Membranen eine halbe Stunde zusammen mit Gangliosid G_{D1a} inkubiert und in einem Aliquot des Ansatzes dessen Umsatz bestimmt. Anschließend wurde der restliche Ansatz aufgeteilt, jeder Teil unterschiedlich mit Inkubationspuffer verdünnt und erneut eine halbe Stunde inkubiert, um wieder den Umsatz zu ermitteln. Abb. 33 zeigt die Ergebnisse für drei verschiedene Grundansätze.

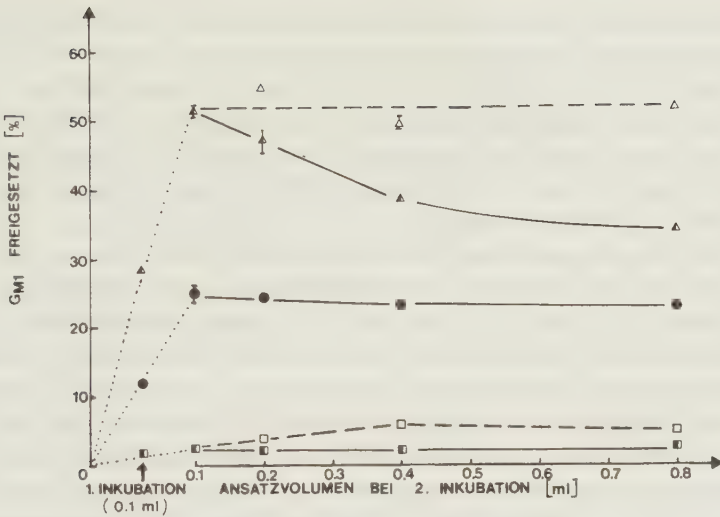


Abb. 33

Abbau von Gangliosid G_{M1} durch die membrangebundene Sialidase bei verschiedenen Inkubationsbedingungen in Abhängigkeit vom Ansatzvolumen

Der Grundansatz (fünffach bzw. achtfach) enthielt je 0.1 ml Volumen 100 μ g mikrosomales Protein (M.F), 0.1 mM $[^3H]$ -Gangliosid G_{M1} , 50 mM Formiatpuffer pH 3.6 und NaCl entsprechend einer Endionenstärke von 150 bzw. 500 mM, sowie gegebenenfalls 0.1% (w/v) Triton X-100. Nach halbstündiger Inkubation bei 37° C wurde der Ansatz auf Eis gekühlt. Es wurden ihm vier bzw. sieben Aliquots zu 100 μ l entnommen und im Rest radiometrisch der relative Gangliosidabbau ermittelt (s. Abschnitt 6.3.3.). Die Aliquots wurden mit dem in der Zeichenerklärung angeführten Puffermedium von pH 3.6 auf das in der Zeichnung angegebene Volumen verdünnt und erneut 30 min bei 37° C inkubiert. Anschließend wurde wieder radiometrisch der relative Gangliosidabbau ermittelt.

Angegeben sind die Mittelwerte von Doppelbestimmungen (d.h. jeweils zwei Grundansätze mit paralleler Versuchsführung), die Standardabweichungen sind eingezeichnet.

- 150 mM Ionenstärke im Grundansatz, verdünnt mit 50 mM Formiatpuffer der Ionenstärke 150 mM (NaCl)
- ▲▲ 150 mM Ionenstärke und 0.1 % Triton X-100 im Grundansatz
 - ▲—▲ verdünnt mit 0.1 % Triton X-100 in 50 mM Formiatpuffer der Ionenstärke 150 mM (NaCl)
 - △—△ verdünnt mit 50 mM Formiatpuffer der Ionenstärke 150 mM (NaCl)
- 500 mM Ionenstärke im Grundansatz, □—□ verdünnt mit 50 mM Formiatpuffer der Ionenstärke 500 mM (NaCl)
 - verdünnt mit 25 mM Formiatpuffer der Ionenstärke 11 mM

Unter Standardinkubationsbedingungen (150 mM Ionenstärke) hatte eine Erhöhung des Ansatzvolumens auf bis das Achtfache keinen Einfluß auf die Geschwindigkeit der Gangliosidspaltung während der Folgeinkubation, in völliger Übereinstimmung mit dem vorgeschlagenen Modell. Bei einem ähnlichen Versuch mit synaptischen Plasmamembranen (in Zusammenarbeit mit E. Acevedo) vermochte selbst eine zwanzigfache Verdünnung des Ansatzes den Gangliosidumsatz nicht zu verlangsamen (215).

Fast noch überzeugender wurden die entwickelten Vorstellungen bestätigt, wenn der Grundansatz 0.1 % Triton X-100 enthielt. Hier gab es zwei Möglichkeiten für die Verdünnung mit Inkubationspuffer, einmal ohne und einmal mit Tritongehalt. Das Detergens löst ja die Membranen in Detergens/Lipid/Protein-Mischaggregate auf, trägt also selbst mit zum wahren Inkubationsvolumen für den Gangliosidabbau bei. Eine Verdünnung mit tritonhaltigem Puffer bedeutet daher eine echte Verringerung der Gangliosidkonzentration in den Mischaggregaten. Der Grundansatz enthielt je mg mikrosomalen Proteins etwa 1 mg Membranlipid (vgl. Abschnitt 3.2.) und 1 mg Triton X-100, zusammen also 2 mg an hydrophober Phase. Im mit tritonhaltigem Puffer achtfach verdünnten Ansatz dagegen betrugen die entsprechenden Mengen 1 mg Membranlipid und 8 mg Triton X-100, zusammen also 9 mg. Diese Erhöhung des wirklichen Reaktionsvolumens für die sialidasekatalysierte Gangliosidspaltung auf schätzungsweise gut das Vierfache paßt ausgezeichnet zur beobachteten Verringerung der Umsatzgeschwindigkeit auf etwa ein Viertel des Vergleichswerts (s. Abb. 33). Doch sollte dann nicht aufgrund der gleichen Argumente die Abbaurate in völliger Abwesenheit von Triton, d.h. unter Standardinkubationsbedingungen, noch größer sein als dieser Vergleichswert? Daß dem nicht so ist, beinhaltet nicht einen Widerspruch zum Modell, sondern hat seine Ursache in der vom Detergens bewirkten Auflösung des Membranverbands und den damit stark veränderten Wegen und Geschwindigkeiten für die Diffusion des Gangliosids zur Sialidase.

Neben der schönen Bestätigung der Modellvorstellungen kann der dargestellte Versuchsaufbau aber auch Antworten liefern zu Fragen nach der Reversibilität bestimmter Einflüsse auf die Sialidaseaktivität, weil er es erlaubt, ein beeinflussendes wasserlösliches Agens einfach wieder aus dem Ansatz herauszuverdünnen. Nach dieser Strategie wurde anhand des dritten Grundansatzes von Abb. 33 versucht, Auskunft darüber zu erhalten, ob die in Abschnitt 2.4.3. und auch in anderen Abschnitten beobachtete Erniedrigung des

Gangliosidumsatzes durch hohe Ionenstärken auf einer reversiblen Hemmung oder - wie mehrfach vermutet - auf einer irreversiblen Inaktivierung der Sialidase beruht. In Gegenwart einer Ionenstärke von 500 mM betrug die Abbaurate weniger als ein Siebtel derjenigen bei physiologischer Ionenstärke. Verdünnte man nun den Ansatz mit einem Puffer geringer Ionenstärke (11 mM) - z.B. auf das vierfache Volumen, was einer Ionenstärke im Ansatz von 133 mM entspricht -, so kam es lediglich zur Unterbindung einer weiteren Inaktivierung während der Folgeinkubation und der Umsatz erreichte maximal ein Drittel des Werts unter von Anfang an physiologischer Ionenstärke. Dieser offenbar überwiegend irreversible Charakter der Inhibierung unterstützt die bereits früher gegebene Deutung, daß hohe Ionenstärken die Sialidase selbst inaktivieren, möglicherweise durch Proteindenaturierung.

Um ganz sicher zu gehen, daß die beobachtete Unabhängigkeit des Gangliosidumsatzes vom Ansatzvolumen nicht vielleicht auf einem unbekannten Artefakt beruhte, wurde auf gleiche Weise auch der Abbau des Sialidasesubstrats 4-MU-NeuAc untersucht (Abb. 34). Wie für ein wasserlösliches Substrat zu erwarten, fiel der Umsatz von 4-MU-NeuAc mit steigender Verdünnung des Ansatzes mit Inkubationspuffer stark ab, so daß das unterschiedliche Verhalten von lipidlöslichem (Abb. 33) und wasserlöslichem (Abb. 34) Substrat sehr deutlich zum Ausdruck kommt. Der Anstieg der Abbauwerte bei Verdünnung mit Puffer geringer Ionenstärke beinhaltet nicht die Aufhebung einer durch 150 mM Ionenstärke verursachten reversiblen Hemmung, sondern ist Ausdruck einer im Vergleich mit Abb. 33 wesentlich stärker in Erscheinung tretenden Inaktivierung der Sialidase während der Inkubationszeit (trotz doppelter Inkubationszeit bei der 2. Inkubation nur ein gleich großer prozentualer Abbau !). Mit abnehmender Ionenstärke nahm das Ausmaß der Inaktivierung während der Folgeinkubation ebenfalls ab und der Abbau näherte sich Werten, wie sie bei gegenüber der ersten Inkubation unveränderter Sialidaseaktivität, aber doppelter Inkubationszeit, zu erwarten wären. Durch Hexanol wurde die Inaktivierung deutlich verstärkt, ohne daß ein Herausverdünnen des Alkohols während der 2. Inkubation das in Analogie zur höheren Ionenstärke hätte wieder aufheben können.

Insgesamt ergibt sich damit eine klare Bestätigung der entwickelten Vorstellung, daß für das Gangliosidsubstrat nicht der wässrige Ansatz - wie im Fall des wasserlöslichen Substrats -, sondern die sialidasehaltige Membran den wirklichen Reaktionsraum darstellt. Im nächsten Abschnitt soll nun die

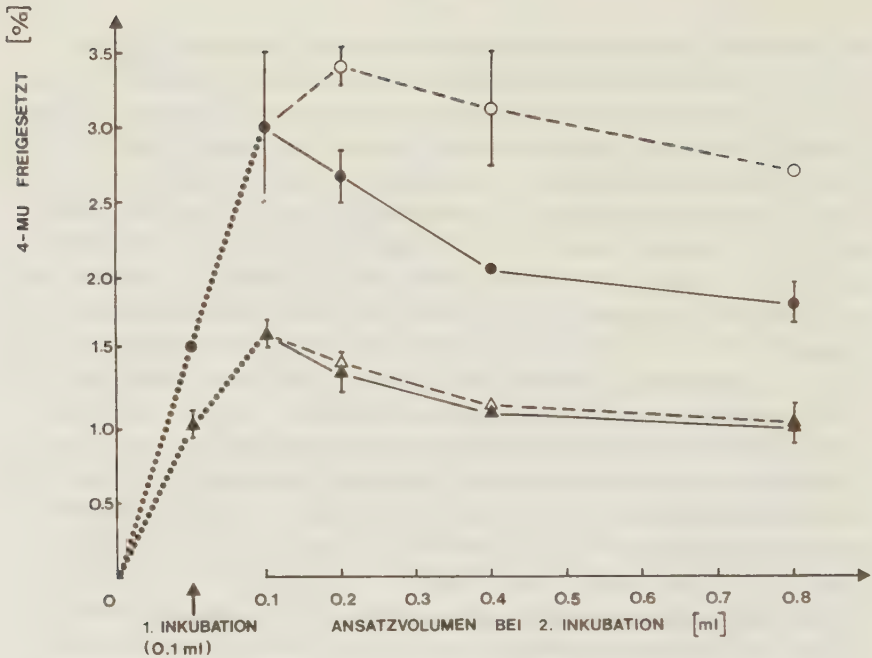


Abb. 34

Abbau von 4-MU-NeuAc durch die membrangebundene Sialidase bei verschiedenen Inkubationsbedingungen in Abhängigkeit vom Ansatzvolumen

Der Grundansatz (neunfach) enthielt je 0.1 ml Volumen 100 µg mikrosomales Protein (M.E), 0.2 mM 4-MU-NeuAc, 50 mM Formiatpuffer pH 3.6 und NaCl entsprechend einer Endionenstärke von 150 mM, sowie gegebenenfalls 24 mM n-Hexanol (zuge setzt in Form der gesättigten wässrigen Lösung der Konzentration 61 mM). Er wurde 30 min bei 37° C inkubiert und dann auf Eis gekühlt. Es wurden ihm acht Aliquots zu 100 µl entnommen und in einem von ihnen fluorimetrisch der relative Substratabbau ermittelt (s. Abschnitt 6.3.1.). Die anderen Aliquots wurden mit dem in der Zeichenerklärung angeführten Puffermedium von pH 3.6 auf das in der Zeichnung angegebene Volumen verdünnt und erneut, diesmal 60 min, bei 37° C inkubiert. Anschließend wurde wieder fluorimetrisch der relative Substratabbau ermittelt. Angegeben sind die Mittelwerte von Doppelbestimmungen (d.h. jeweils zwei Grundansätze mit paralleler Versuchsführung), die Standardabweichungen sind eingezeichnet.

- , ○ 150 mM Ionenstärke im Grundansatz
- ▲, △ 150 mM Ionenstärke und 24 mM n-Hexanol im Grundansatz
- verdünnt mit 50 mM Formiatpuffer der Ionenstärke 150 mM (NaCl)
- verdünnt mit 25 mM Formiatpuffer der Ionenstärke 11 mM
- ▲—▲ verdünnt mit 24 mM n-Hexanol in 50 mM Formiatpuffer der Ionenstärke 150 mM (NaCl)
- △--△ verdünnt mit 50 mM Formiatpuffer der Ionenstärke 150 mM (NaCl)

nächste Konsequenz daraus, nämlich die untrennbare Verknüpfung von Enzymmenge und Reaktionsraum, näher beleuchtet werden.

4.3. Abhängigkeit der spezifischen Geschwindigkeit und der Michaelis-Konstanten für den sialidasekatalysierten Substratumsatz von der eingesetzten Enzymmenge

Jede Veränderung der zum Enzymtest eingesetzten Menge an membrangebundener Sialidase beinhaltet gleichzeitig eine Veränderung der Membranmenge und damit des Reaktionsvolumens für den Gangliosidabbau. Wie in Abschnitt 3.3. abgeleitet, sollte das eine hyperbole Abhängigkeit der Umsatzrate für Gangliosid G_{D1a} von der eingesetzten Menge an mikrosomalem Protein bedingen, bzw. mathematisch dazu gleichwertig ein stetes Absinken der auf die Proteinmenge bezogenen spezifischen Umsatzgeschwindigkeit. Widersprechen dem aber nicht die zu Beginn dieser Arbeit (Abb. 4 in Abschnitt 2.1.3.) vorgestellten Ergebnisse, wonach nicht nur der Umsatz des wasserlöslichen Sialidasesubstrats, sondern auch der von Gangliosid G_{D1a} linear mit der Proteinmenge zunahm, mit einer konstanten Steigung von ca. $29 \frac{\text{nmol}}{\text{h} \cdot \text{mg}}$. Dabei ist zu bedenken, daß die genannten Aktivitätsbestimmungen in Gegenwart von 0.2 % Triton X-100 durchgeführt wurden, jeder Ansatz von vornherein also bereits 0.2 mg lipophile Phase enthielt, zu der dann - bezogen auf den linearen Teil der Kurve - nochmal maximal rund 0.2 mg mikrosomales Lipid hinzukamen. Außerdem lag die eingesetzte Gangliosidmenge wegen der kleinen Michaelis-Konstante in Gegenwart von Triton (vgl. Tab. 7, in Abschnitt 2.5.1.) vermutlich nicht mehr weit entfernt von Bedingungen der Substratsättigung, so daß das höchstens verdoppelte Reaktionsvolumen möglicherweise keine deutliche Krümmung der Proteinabhängigkeit hatte hervorrufen können. Daß dem offensichtlich so sein muß, veranschaulicht Abb. 35. In Abwesenheit von Detergens nahm der Gangliosidabbau nämlich keineswegs linear mit der eingesetzten Menge an membrangebundener Sialidase zu, sondern näherte sich mehr und mehr einem Grenzwert. Zum Vergleich ist die entsprechende, demgegenüber aber lineare, Kurve für die Spaltung von 4-MU-NeuAc nochmals dargestellt.

Wie in Abschnitt 3.3. ausgeführt, sollte diese unterproportionale Zunahme des Gangliosidumsatzes mit der eingesetzten Proteinmenge enzymkinetisch auf einem Ansteigen der scheinbaren Michaelis-Konstanten K_M infolge des anwach-

Abb. 35 a

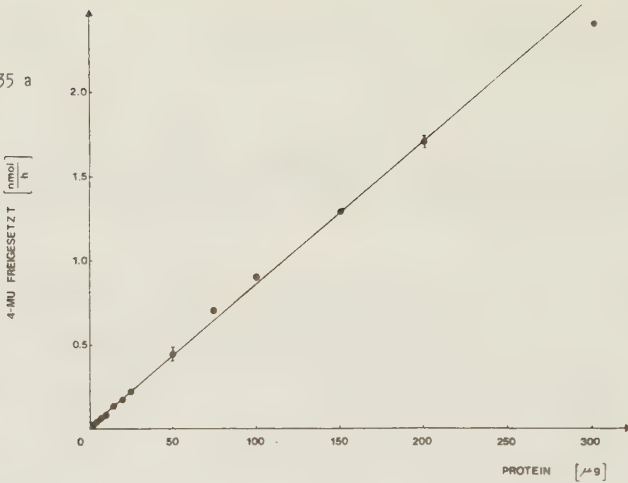


Abb. 35 b

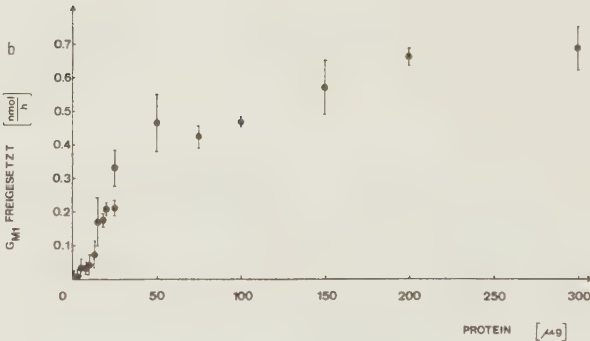


Abb. 35

Umsatz von 4-MU-NeuAc (a) und Gangliosid G_{D1a} (b) in Abhängigkeit von der eingesetzten Menge an membrangebundener Sialidase

0.1 ml Ansatz enthielten die angegebenen Mengen an mikrosomalem Protein (M.C bzw. M_2H), 0.2 mM 4-MU-NeuAc bzw. 0.1 mM $[^3H]$ -Gangliosid G_{D1a} , 100 mM Acetatpuffer pH 4.2, 5 mM Ca^{2+} und NaCl entsprechend einer Endionenstärke von 150 mM. Nach einstündiger Inkubation bei 37° C wurde der 4-MU-NeuAc-Abbau fluorimetrisch (s. Abschnitt 6.3.1.) und der Gangliosidabbau radiometrisch nach vorhergehender Dünnschichtchromatographie (214, 223, vgl. Abschnitt 2.1.2.3.) ermittelt. Angegeben sind die Mittelwerte von Doppelbestimmungen, die Standardabweichungen sind eingezeichnet.

senden, realen Reaktionsvolumens beruhen. Um dies experimentell zu bestätigen, wurden in Gegenwart verschiedener Mengen an mikrosomalem Protein jeweils die Umsatzgeschwindigkeiten in Abhängigkeit von der Gangliosidkonzentration gemessen und daraus die Werte für K_M und V_{max} berechnet. Während die auf die Proteinmenge bezogene Maximalgeschwindigkeit V_{max} nur wenig - von 2.1 auf $2.8 \frac{\text{nmol}}{\text{h} \cdot \text{mg}}$ - zunahm (die vergleichsweise kleinen V_{max} -Werte sind zum einen eine Eigenheit der verwendeten Mikrosomenpräparation und zum andern eine Folge der Anwesenheit von Ca^{2+} in den Testansätzen), stieg der Wert für K_M in der Tat in etwa linear mit der Proteinmenge an (Abb. 36). Aus der Steigung der Kurve errechnet sich eine auf die Proteinmenge bezogene Michaelis-Konstante K'_M von $0.06 \frac{\mu\text{mol Gangliosid}}{\text{mg Protein}}$.

In Zusammenarbeit mit E. Acevedo (215) wurde auch für die membrangebundene Sialidase synaptischer Plasmamembranen eine ähnliche Abhängigkeit der Michaelis-Konstante vom Proteingehalt der Testansätze gefunden, mit einem Wert für K'_M von $0.2 \frac{\mu\text{mol}}{\text{mg}}$. Zur Gegenüberstellung sind die enzymkinetischen Parameter für den Umsatz von 4-MU-NeuAc in Gegenwart verschiedener Mengen an membrangebundener Sialidase in Tab. 10 zusammengefaßt. Wie für ein waserlösliches Substrat zu erwarten, veränderten sich in diesem Fall die Michaelis-Konstanten nicht mit der Proteinmenge, sondern schwankten lediglich um einen mittleren Wert von ca. 0.9 mM. Die mit beiden Sialidasesubstraten auftretende leichte Zunahme von V_{max} mit der Proteinmenge mag eventuell mit einer beobachteten teilweisen Adsorption mikrosomaler Membranen an die Wandung der Inkubationsgefäße zusammenhängen, die bei größeren Proteinmengen nicht mehr ins Gewicht fällt.

Insgesamt läßt sich wieder eine überzeugende experimentelle Bestätigung des entworfenen Modells feststellen, die in den nächsten Abschnitten nach Möglichkeit auch auf das Konzept der lateralen Diffusion des Gangliosids zur membrangebundenen Sialidase ausgedehnt werden soll.

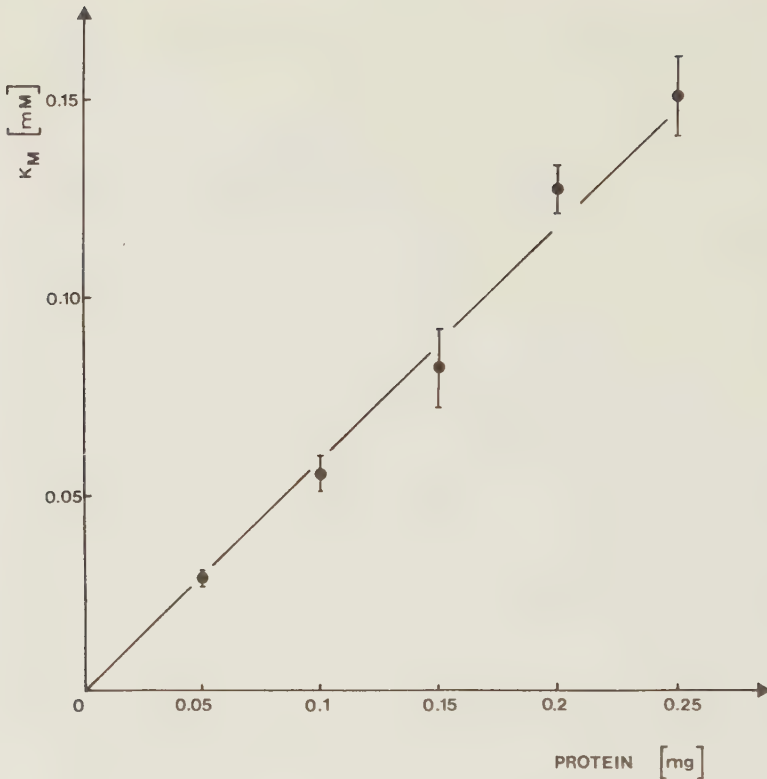


Abb. 36

Abhängigkeit der Michaelis-Konstante K_M für die Gangliosidspaltung von der eingesetzten Menge an membrangebundener Sialidase

0.1 ml Ansatz (jeweils Dreifachbestimmungen) enthielten die angegebenen Mengen an mikrosomalem Protein (M.C.), verschiedene Konzentrationen an [^3H]-Gangliosid G_{M1a} , 100 mM Acetatpuffer pH 4.2, 5 mM Ca^{2+} und NaCl entsprechend einer Endionenstärke von 150 mM. Nach einstündiger Inkubation bei 37° C wurde der Gangliosidumsatz radiometrisch ermittelt (s. Abschnitt 6.3.3.). Aus der so für jede Proteinmenge erhaltenen Substratabhängigkeit wurden anhand verschiedener Verfahren zur Kurvenanpassung die Michaelis-Konstanten berechnet und jeweils gemittelt. Diese Mittelwerte sind angegeben, zusammen mit der Streuung aufgrund der verschiedenen Rechenverfahren (vgl. Abschnitt 6.3.6.)

Tab. 10

Michaelis-Konstanten K_M und Maximalgeschwindigkeiten V_{max} für die Spaltung von 4-MU-NeuAc durch verschiedene Mengen an membrangebundener Sialidase

0.1 ml Ansatz (jeweils Doppelbestimmungen) enthielten die angegebenen Mengen an mikrosomalem Protein (M.B), verschiedene Konzentrationen an 4-MU-NeuAc, 50 mM Formiatpuffer pH 3.6 und NaCl entsprechend einer Endionenstärke von 150 mM. Nach einstündiger Inkubation bei 37° C wurde der Substratsatz fluorimetrisch ermittelt (s. Abschnitt 6.3.1.). Aus der so für jede Proteinmenge erhaltenen Substratabhängigkeit wurden anhand verschiedener Verfahren zur Kurvenanpassung Werte für K_M und V_{max} berechnet und jeweils gemittelt. Diese Mittelwerte sind angegeben, zusammen mit der V_{max} Streuung aufgrund der verschiedenen Rechenverfahren (vgl. Abschnitt 6.3.6.).

Proteinmenge [mg je Ansatz]	K_M [mM]	V_{max} [nmol h·mg]
0.05	0.87 ± 0.09	32 ± 2
0.10	0.98 ± 0.18	40 ± 7
0.20	1.00 ± 0.05	41 ± 1
0.30	0.88 ± 0.07	39 ± 1

4.4. Einfluß der Membranfluidität auf den Substratsatz durch die membrangebundene Sialidase

Als letzte Konsequenz aus dem vorgeschlagenen Modell sollte nach Abschnitt 3.4. der Gangliosidsatz durch die membrangebundene Sialidase wegen der vorgeschalteten lateralen Diffusion des Substrats zum Enzym stark von der Viskosität der mikrosomalen Membranen abhängen, die wiederum durch verschiedene lipidlösliche Substanzen, wie z.B. Anästhetika, verändert werden kann. Aus der Vielzahl solcher Agentien wurde für die beabsichtigten Versuche die homologe Reihe der primären, unverzweigten Alkohole ausgewählt, da sie im enzymatischen Test ohne größere Schwierigkeiten einsetzbar sind und auch von anderen Arbeitsgruppen häufig verwendet wurden, wenn membranvermittelte Phänomene untersucht werden sollten, ohne die Membranstrukturen aufzulösen (z.B.: Löslichkeit in Membranen: 86, 103, Ü 230; Phasenumwandlung in Lipiden: 85, 125, 144, 106, Ü 101; Membranviskosität bzw. -struktur:

179, 131, 299, 20; enzymatische Reaktionen: 103, 264, Ü 58; Anästhetische Eigenschaften: Ü 230). Der Einsatz einer ganzen Reihe von Verbindungen statt nur eines Vertreters wurde vorgezogen, um nach Möglichkeit Kriterien dafür zu erhalten, ob beobachtete Veränderungen des Gangliosidumsatzes lediglich auf spezielle Effekte eines einzelnen Agens oder auf einen allgemeinen, unspezifischen Einfluß der Membranviskosität zurückgehen. Wollte aber die Auswirkung von Lateraldiffusion und Membranfluidität auf den Gangliosidumsatz nicht nur qualitativ untersucht werden, so mußte zuerst eine praktikable Methode zu deren quantitativer Erfassung gefunden werden.

4.4.1. Bestimmung der Fluidität mikrosomaler Membranen

Ideal wäre es nach Abschnitt 3.4., wenn man unter verschiedenen Bedingungen die laterale Diffusionsgeschwindigkeit von Gangliosid G_{D1a} in den sialidasehaltigen Membranen direkt messen könnte. Prinzipiell ist dies mit Photobleichtechniken (5, 152, 114, 234) möglich, wie für ein fluoreszenzmarkiertes Gangliosid- G_{M1} -Analogon gezeigt wurde (221, 43). Doch leider stand diese Technik in unserem Arbeitskreis nicht zur Verfügung, so daß auf eine Bestimmung der Membranfluidität ausgewichen werden mußte, zu der der laterale Diffusionskoeffizient proportional ist (vgl. Abschnitt 3.4.). Allerdings ist die physikalische Größe "Viskosität" bzw. ihr Kehrwert, die "Fluidität", in bezug auf zweidimensionale Membransysteme nur schlecht definiert. In der Literatur werden so verschiedene Meßmethoden und daraus abgeleitete Parameter wie Elektronenspinresonanz (Ordnungsparameter, Rotationskorrelationszeit), Kernresonanz (Relaxationszeit, Ordnungsparameter, Quadrupolaufspaltung, lateraler Diffusionskoeffizient), Differentialpolarisationsphasenfluorimetrie (Fluoreszenzanisotropie, Rotationsgeschwindigkeit) und Fluoreszenzdepolarisation (Fluoreszenzanisotropie, Rotationskorrelationszeit, Mikroviskosität, Reibungskoeffizient, Ordnungsparameter) zur Charakterisierung der dynamischen Eigenschaften künstlicher und natürlicher Membranen benutzt. Alle diese Methoden geben in der Regel ein qualitativ ähnliches Bild von der "Membranfluidität", quantitativ können sie aber recht unterschiedliche Ergebnisse liefern.

Für die eigenen Untersuchungen kam von den erwähnten Verfahren vor allem die Messung der Gleichgewichtsfluoreszenzdepolarisation in Frage, da im Arbeitskreis die hierfür nötigen Geräte und Erfahrungen (208, 180, 214)

zur Verfügung standen. Bei dieser Technik wird mit Hilfe linear polarisierten Lichts die Beweglichkeit eines fluoreszierenden Sondernukleins innerhalb der Membran erfaßt und daraus auf die Fluidität der Membran geschlossen. Eine genauere Beschreibung der Theorie sowie der verschiedenen Auswertverfahren findet sich in Abschnitt 6.6.1.. Dort ist auch dargelegt, daß unter den eingehaltenen Bedingungen einfach der Kehrwert der gemessenen Fluoreszenzpolarisation, $\frac{1}{P}$, vermindert um den Beitrag $\frac{1}{P_0}$ bei völlig unbeweglicher Sonde, als Maß für die Membranfluidität dienen kann.

In Abb. 37a sind die für mikrosomale Membranen ermittelten Werte für $(\frac{1}{P} - \frac{1}{P_0})$ gegen die Ansatzkonzentrationen der primären Alkohole Methanol bis n-Octanol aufgetragen. Alle Alkohole bewirkten mit steigender Konzentration eine stetige Zunahme der Fluidität, wobei eine Kettenverlängerung um eine CH_2 -Gruppe die für den gleichen Effekt benötigte Alkoholkonzentration jeweils um den Faktor 3 absenkte. Soweit aus der Literatur (299, 116) zu einigen der verwendeten Alkohole Vergleichsdaten über ihren Einfluß auf die Fluoreszenzdepolarisation bekannt sind, stimmen sie - sogar quantitativ - gut mit den erhaltenen Ergebnissen für Hirnmikrosomen überein, obwohl sie an anderen biologischen Membranen gewonnen wurden. Auch mit der Technik der Elektronenspinresonanz wurden qualitativ recht ähnliche Resultate erzielt (179).

In Abb. 37 a fällt auf, daß die maximal erreichte Membranfluidität mit steigender Kettenlänge des Alkohols abnahm. Dies hat eine einfache experimentelle Ursache. Die Alkohole wurden den Meßansätzen in Form ihrer, gegebenenfalls gesättigten, wässrigen Lösung zugesetzt, so daß aufgrund des dafür zur Verfügung stehenden Volumenanteils (vgl. Abschnitt 6.6.2.) die Alkoholkonzentrationen im Ansatz etwa 40 % der Sättigungskonzentration nicht überschreiten konnten. Bei dieser gleichen relativen Sättigung des Ansatzes mit den verschiedenen Alkoholen nahm also die Wirksamkeit mit der Kettenlänge ab. Diese auf den ersten Blick etwas verwirrenden Befunde werden leicht verständlich, wenn man sich vor Augen hält, daß für die beobachteten Veränderungen der Membranviskosität nur indirekt die Alkoholkonzentrationen im Meßansatz ausschlaggebend sind, unmittelbar aber die Mengen an Alkohol, die nach Maßgabe des jeweiligen Membran/Puffer-Verteilungskoeffizienten von den Membranen aufgenommen wurden. Seeman und Mitarbeiter (229, 200, Ü 230) haben solche Verteilungskoeffizienten für verschiedene Alkohole und Membranen, insbesondere Erythrocyten-Ghosts, gemessen bzw. ab-

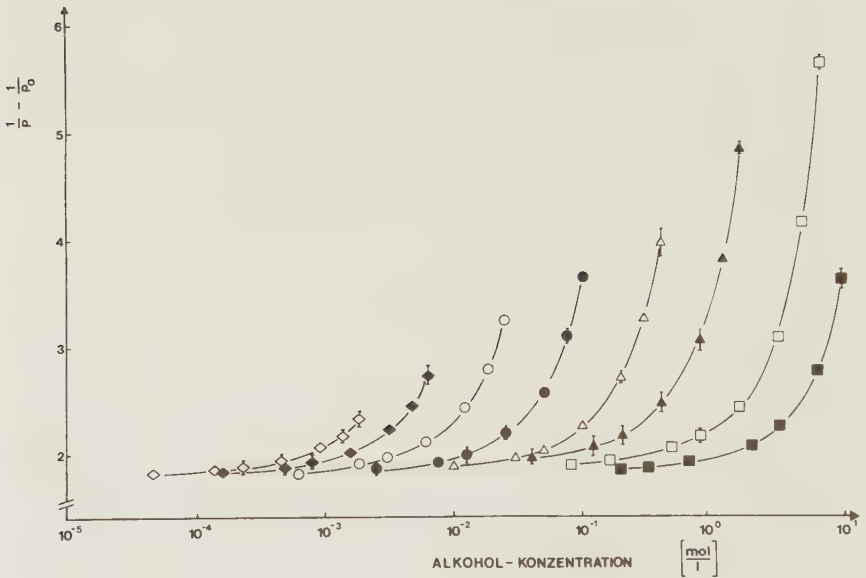


Abb. 37 a

Einfluß der primären n-Alkohole Methanol bis Octanol auf die Fluidität mikrosomaler Membranen

0.2 ml Meßansatz enthielten 200 µg mikrosomales Protein (M.B), 0.2 nmol DPH, 6 mM Tris/HCl-Puffer pH 7.2 und die angegebenen Konzentrationen der verschiedenen n-Alkohole. Die Alkohole wurden den Ansätzen in Form ihrer, gegebenenfalls gesättigten, wässrigen Lösungen zugesetzt. Die Fluoreszenzpolarisation P wurde, wie in Abschnitt 6.6.2. beschrieben, gemessen und in den Ausdruck $\frac{1}{P} - \frac{1}{P_0}$ (mit $P_0 = 0.46$) umgerechnet, der nach Abschnitt 6.6.1. ein gutes Maß für die Membranfluidität darstellt. Angegeben sind die Mittelwerte aus jeweils mindestens drei getrennten Bestimmungen, die Standardabweichungen sind eingezeichnet.

- | | |
|--------------|--------------|
| ■ Methanol | ● n-Pentanol |
| □ Äthanol | ○ n-Hexanol |
| ▲ n-Propanol | ◆ n-Heptanol |
| △ n-Butanol | ◇ n-Octanol |

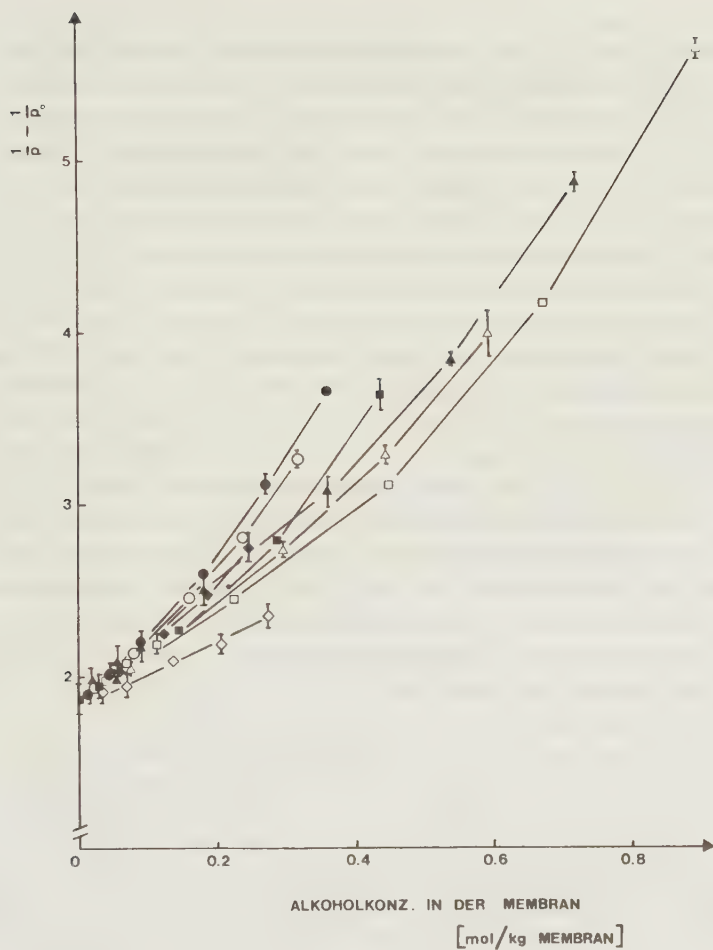


Abb. 37 b

Einfluß der primären n-Alkohole Methanol bis Octanol auf die Fluidität mikrosomaler Membranen
 Es sind die gleichen Daten wie in Abb. 37 a dargestellt, doch wurden die auf das Ansatzvolumen bezogenen Alkoholkonzentrationen anhand der Membran/Puffer-Verteilungskoeffizienten ($\bar{U}$ 230) in Membrankonzentrationen umgerechnet.
 Es wurden die gleichen Symbole wie in Abb. 37 a verwendet.

geschätzt. Die Verteilungskoeffizienten nehmen mit der Kettenlänge in etwa exponentiell zu, d.h. die höheren Alkohole bevorzugen zunehmend die Membranphase. Unter der Annahme, daß diese Verteilungskoeffizienten denen für Kalbshirnmikrosomen recht ähnlich sein dürften, wurden sie zur Umrechnung der wässrigen Alkoholkonzentrationen in Membrankonzentrationen benutzt. Wie aus Abb. 37 b ersichtlich, waren alle Alkohole bei gleicher Membrankonzentration in erster Näherung gleich wirksam, was auch Zavoico und Kutchai (299) für Herzmikrosomen feststellen konnten.

Lediglich die Kurve für Octanol weicht deutlich von der der anderen Alkohole ab, doch beruht dies, zumindest zum Teil, auf einer Vernachlässigung der von den mikrosomalen Membranen aufgenommenen Alkoholmenge und der dadurch verursachten Erniedrigung der Alkoholkonzentration im Ansatz. Bei den anderen Alkoholen ist dieser Fehler sehr klein, doch im Fall von Octanol läßt sich mit den Annahmen von Abschnitt 3.2. abschätzen, daß aufgrund des hohen Verteilungskoeffizienten etwa ein Fünftel bis ein Viertel des Alkoholgehalts des Ansatzes in der Membranphase gelöst ist. Die tatsächlichen Membrankonzentrationen an Octanol dürften daher jeweils ca. 20 % niedriger gewesen sein, als in Abb. 37 b eingezeichnet. Wenn man dies berücksichtigt, so weicht Octanol von einer mittleren Wirksamkeit nicht mehr ab als andere Alkohole, ganz abgesehen davon, daß ja auch die Verteilungskoeffizienten einem experimentellen Fehler unterliegen und nicht für mikrosomale Membranen bestimmt wurden. Damit erklärt sich die aus Abb. 37 a gefolgerte Zunahme der fluidisierenden Wirkung der Alkohole mit der Kettenlänge lediglich als Resultat des im gleichen Ausmaß zunehmenden Membran/Puffer-Verteilungskoeffizienten.

Hingegen läßt sich bei genauerem Hinsehen aus Abb. 37 b mit einiger Berechtigung ablesen, daß bei gleicher Membrankonzentration die Alkohole mit ungeraden Kohlenstoffzahlen (ausgefüllte Symbole) die Membranviskosität immer etwas stärker absenkten als die mit geraden (offene Symbole). Die einzige Ausnahme bildete n-Hexanol, das in seiner Effektivität den ungeradzahligen Alkoholen glich. Die stärkere Störung des Membranverbands durch ungeradzahlige Alkohole steht in Übereinstimmung mit dem Modell von Jain und Wu (Ü 101), wonach sich diese Alkohole wegen der cis-Anordnung der beiden Moleküle-Endgruppen schlechter in die regelmäßige Packung der Fettsäureketten der Membranlipide einfügen als Alkohole mit gerader Kohlenstoffzahl und damit trans-ständigen Endgruppen.

Abschließend zu diesem Abschnitt über die Fluidität mikrosomaler Membranen muß noch auf die Ansatzbedingungen eingegangen werden, unter denen sie gemessen wurde. Im folgenden soll ja der Einfluß der Membranfluidität auf den Umsatz von Gangliosid G_{D1a} durch die membrangebundene Sialidase untersucht werden, so daß nach Möglichkeit gleiche Meßbedingungen wie bei den Enzymtests wünschenswert gewesen wären. Wie in Abschnitt 6.6.3. ausgeführt, war aber eine Messung der Fluoreszenzdepolarisation bei sauren pH-Werten wegen der auftretenden Aggregation der mikrosomalen Membranen nicht durchführbar. Außerdem wurde die Fluidität gewöhnlich in Gegenwart einer Ionenstärke von ca. 5 mM ermittelt, die Enzymaktivität dagegen auch oft bei physiologischer Ionenstärke von 150 mM. Höhere Ionenstärken führten zwar zu einer stärkeren Trübung der Meßansätze, die Fluoreszenzausbeute blieb aber davon unberührt, und so wurde stellvertretend für die anderen Alkohole die Membranfluidität in Abhängigkeit von der Hexanolkonzentration auch in Gegenwart physiologischer Ionenstärke bestimmt (Tab. 11). Es stellte sich heraus, daß weder die Fluidität unbehandelter Mikrosomen noch der Einfluß des Alkohols auf die Fluidität durch die erhöhte Ionenstärke irgendwie verändert wurde. Die Annahme erscheint daher gerechtfertigt, daß die gemessenen Veränderungen der Membranfluidität durch die homologe Reihe der Alkohole auch unter den Bedingungen des enzymatischen Tests gelten.

4.4.2. Substratumsatz durch die membrangebundene Sialidase bei erhöhter Membranfluidität

Die im vorhergehenden Abschnitt beschriebenen Versuche hatten gezeigt, daß die Reihe der primären Alkohole die Viskosität mikrosomaler Membranen stark abzusenken vermochte. Nach den Modellvorstellungen von Abschnitt 3.4. sollte damit eine erleichterte Diffusion des Gangliosids in der Membranebene und demzufolge ein beschleunigter Gangliosidabbau durch die membrangebundene Sialidase verknüpft sein. Daher wurde der sialidasekatalysierte Umsatz von Gangliosid G_{D1a} in Gegenwart der gleichen Alkoholkonzentrationen ermittelt, wie sie auch bei den Fluoreszenzdepolarisationsmessungen Verwendung gefunden hatten. Auf eine gleichzeitige Bestimmung der Menge des in die sialidasehaltigen Membranen eingebauten Gangliosids wurde verzichtet, zum einen wegen des großen experimentellen Auf-

Tab. 11

Einfluß der Ionenstärke auf die Fluidität mikrosomaler Membranen in Gegenwart verschiedener Konzentrationen an n-Hexanol

0.2 ml Meßansatz enthielten 200 µg mikrosomales Protein (M.8), 0.2 nmol DPH, 6 mM Tris/HCl-Puffer pH 7.2 und die angegebenen Konzentrationen an n-Hexanol, sowie gegebenenfalls 150 mM NaCl. n-Hexanol und NaCl wurden den Ansätzen in Form wässriger Lösungen zugesetzt. Die Fluoreszenzpolarisation P wurde, wie in Abschnitt 6.6.2. beschrieben, gemessen und in den Ausdruck $\frac{1}{P} - \frac{1}{P_0}$ (mit $P_0 = 0.46$) umgerechnet, der nach Abschnitt 6.6.1. ein gutes Maß für die Membranfluidität darstellt.

Angegeben sind die Mittelwerte aus mindestens drei getrennten Bestimmungen, sowie die Standardabweichungen.

Konzentration an n-Hexanol [mM]	Membranfluidität ($\frac{1}{P} - \frac{1}{P_0}$)	
	5 mM Ionenstärke	155 mM Ionenstärke
0	1.83 ± 0.03	1.80 ± 0.02
0.61	1.84 ± 0.05	1.84 ± 0.02
1.8	1.93 ± 0.03	1.90 ± 0.03
3.1	1.99 ± 0.04	1.95 ± 0.03
6.1	2.14 ± 0.02	2.06 ± 0.07
12	2.46 ± 0.00	2.43 ± 0.04
18	2.81 ± 0.03	2.84 ± 0.06

wands und zum anderen wegen der Resultate von Abschnitt 4.1., wonach die qualitativen Aussagen durch die unterschiedlichen Einbaugeschwindigkeiten nicht verändert werden (s. auch nachfolgende Kontrolluntersuchungen).

Wie aus Abb. 38 a ersichtlich, vermochten alle Alkohole den Gangliosidabbau zu stimulieren, die niederen Alkohole Methanol, Äthanol und Propanol allerdings nur geringfügig und bei nicht zu hohen Konzentrationen. Im molaren Bereich hemmten diese Alkohole die Sialidaseaktivität bis zur völligen Inaktivierung, möglicherweise durch Denaturierung des Enzyms. Die höheren Alkohole bewirkten im beobachteten Konzentrationsbereich (bis ca. 40 % der jeweiligen Sättigungskonzentrationen der einzelnen Alkohole in Wasser, vgl. vorhergehenden Abschnitt) ausschließlich eine ausgeprägte Steigerung der Umsatzgeschwindigkeiten bis um das Dreifache.

Wie bereits im vorhergehenden Abschnitt für die Abhängigkeit der Mem-

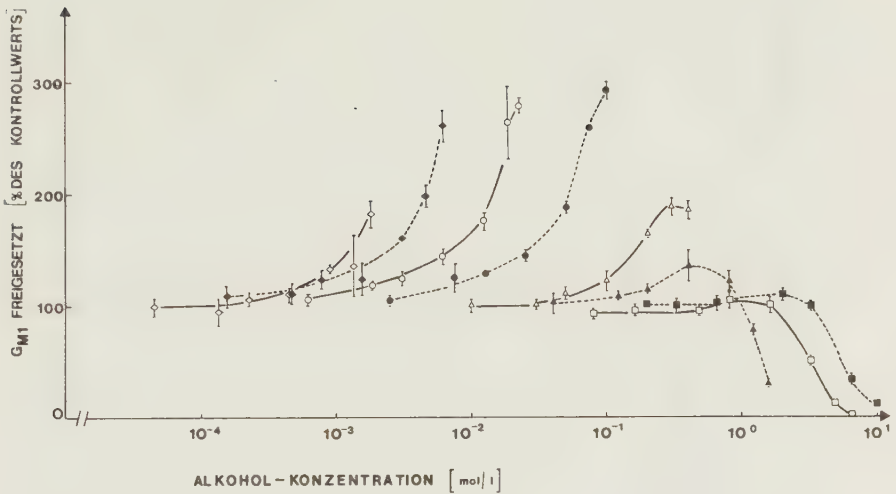


Abb. 38 a

Umsatz von Gangliosid G_{M1} durch die membrangebundene Sialidase in Gegenwart verschiedener Konzentrationen der primären Alkohole Methanol bis n-Octanol

0.1 ml Ansatz enthielten 100 μ g mikrosomales Protein (M.8), 0.1 mM $[^3H]$ -Gangliosid G_{M1} , 50 mM Formiatpuffer pH 3.6, NaCl entsprechend einer Endionenstärke von 150 mM und die angegebenen Konzentrationen der verschiedenen Alkohole. Die Alkohole wurden den Ansätzen in Form ihrer, gegebenenfalls gesättigten, wässrigen Lösungen zugesetzt. Nach einstündiger Inkubation bei 37° C wurde der Gangliosidumsatz radiometrisch ermittelt (s. Abschnitt 6.3.3.). Angegeben sind die Mittelwerte aus jeweils drei Bestimmungen, die Standardabweichungen sind eingezeichnet.

- | | |
|--------------|--------------|
| ■ Methanol | ● n-Pentanol |
| □ Ethanol | ○ n-Hexanol |
| ▲ n-Propanol | ◆ n-Heptanol |
| △ n-Butanol | ◇ n-Octanol |

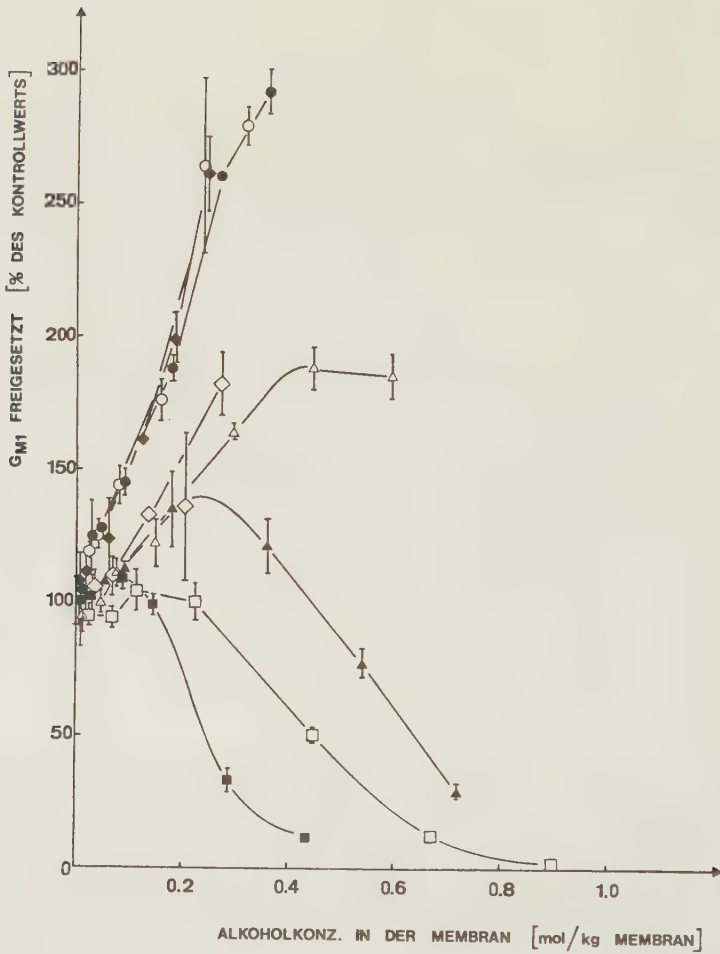


Abb. 38 b

Umsatz von Gangliosid G_{M1} durch die membrangebundene Sialidase in Gegenwart verschiedener Konzentrationen der primären Alkohole Methanol bis n-Octanol

Es sind unter Beibehaltung der Symbole die gleichen Daten wie in Abb. 38 a dargestellt, doch wurden die auf das Ansatzvolumen bezogenen Alkoholkonzentrationen anhand der Membran/Puffer-Verteilungskoeffizienten ($\bar{U}$ 230) in Membrankonzentrationen umgerechnet.

branfluidität von der Alkoholkonzentration beobachtet, nahm auch hier die Wirksamkeit der Alkohole mit der Kettenlänge drastisch zu. Dies läßt sich wieder durch die parallele Zunahme des Membran/Puffer-Verteilungskoeffizienten für die verschiedenen Alkohole erklären. Gleiche Membrankonzentrationen der Alkohole n-Pentanol bis n-Heptanol erhöhten den Gangliosidabbau in völlig gleichem Ausmaß (Abb. 38 b), mit nahezu linearer Abhängigkeit des Umsatzes von der Membrankonzentration. Berücksichtigt man, daß die für Octanol berechneten Membrankonzentrationen um ca. 20 % nach unten korrigiert werden müßten (s. vorhergehenden Abschnitt), so weicht auch seine Wirksamkeit nur geringfügig von der der anderen höheren Alkohole ab, während die kurzkettigen Alkohole Methanol bis Butanol offenbar eine eigene Gruppe bilden (vgl. Ü 101), die durch einen hemmenden Einfluß auf den Gangliosidumsatz gekennzeichnet ist. Davon abgesehen wird aber das entwickelte Modell zum Gangliosidabbau recht schön bestätigt, wonach Substanzen, die die enzymhaltige Membran flüßiger machen, die Umsatzgeschwindigkeit erhöhen sollten, bedingt durch eine erleichterte Lateraldiffusion.

Um diesen Befund zu erhärten und insbesondere einen aktivitätssteigernden Einfluß der Alkohole auf die katalytischen Eigenschaften der Sialidase selbst auszuschließen, wurden auch die Abbauraten für das wasserlösliche Substrat 4-MU-NeuAc in Gegenwart der verschiedenen Alkohole bestimmt, die ja von der lateralen Diffusion unabhängig sein sollten. In Übereinstimmung damit konnte tatsächlich keiner der primären n-Alkohole Methanol bis Octanol im auch vorher eingehaltenen Konzentrationsbereich die enzymatische Spaltung von 4-MU-NeuAc stimulieren (Abb. 39 a). Ganz im Gegenteil führten selbst die höheren Alkohole zu einer Verringerung der Sialidaseaktivität, und die kurzkettigen Alkohole brachten in höheren Konzentrationen die Substratspaltung völlig zum Erliegen.

Bezogen auf die Membrankonzentration (Abb. 39 b) nahm die inhibierende Wirkung der Alkohole mit der Kettenlänge deutlich ab, für jeden einzelnen Alkohol aber linear mit der Membrankonzentration zu. Ein in anderem Zusammenhang besprochener "Verdünnungsversuch" mit n-Hexanol (Abb. 34 in Abschnitt 4.2.) wies darauf hin, daß die Hemmung im wesentlichen irreversibel verläuft, wie es für eine Denaturierung der Sialidase charakteristisch wäre. Auch andere Autoren (132, 168) beschrieben eine Inaktivierung membranboundener Enzyme durch membranfluidisierende Agentien, die sie als Veränderung der Tertiärstruktur des Enzymproteins deuteten.

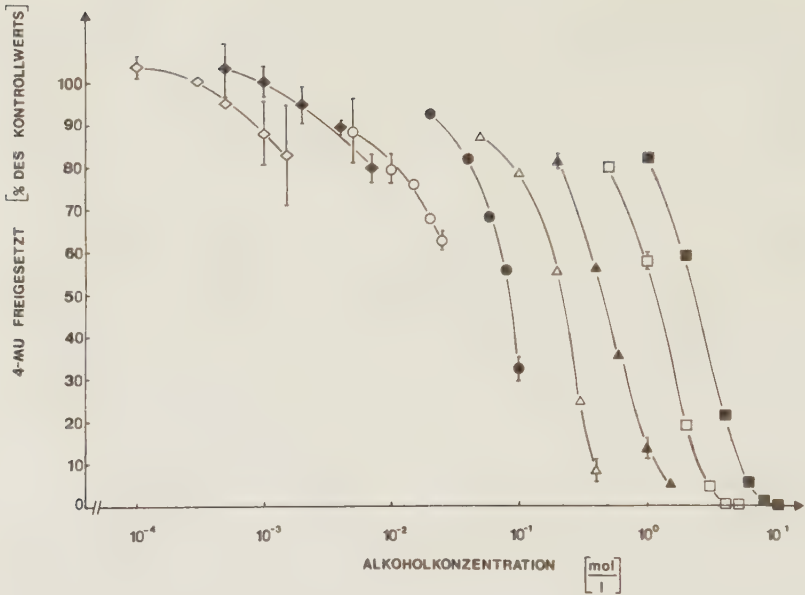


Abb. 39 a

Umsatz von 4-MU-NeuAc durch die membrangebundene Sialidase in Gegenwart verschiedener Konzentrationen der primären Alkohole Methanol bis n-Octanol

0.1 ml Ansatz enthielten 100 µg mikrosomales Protein (M.8), 0.2 mM 4-MU-NeuAc, 50 mM Formiatpuffer pH 3.6, NaCl entsprechend einer Endionenstärke von 150 mM und die angegebenen Konzentrationen der verschiedenen Alkohole. Die Alkohole wurden den Ansätzen in Form ihrer, gegebenenfalls gesättigten, wässrigen Lösungen zugesetzt. Nach einstündiger Inkubation bei 37° C wurde der Substratumsatz fluorimetrisch ermittelt (s. Abschnitt 6.3.1.)

Angegeben sind die Mittelwerte von Doppelbestimmungen, die Standardabweichungen sind eingezeichnet.

- | | |
|--------------|--------------|
| ■ Methanol | ● n-Pentanol |
| □ Äthanol | ○ n-Hexanol |
| ▲ n-Propanol | ◆ n-Heptanol |
| △ n-Butanol | ◇ n-Octanol |

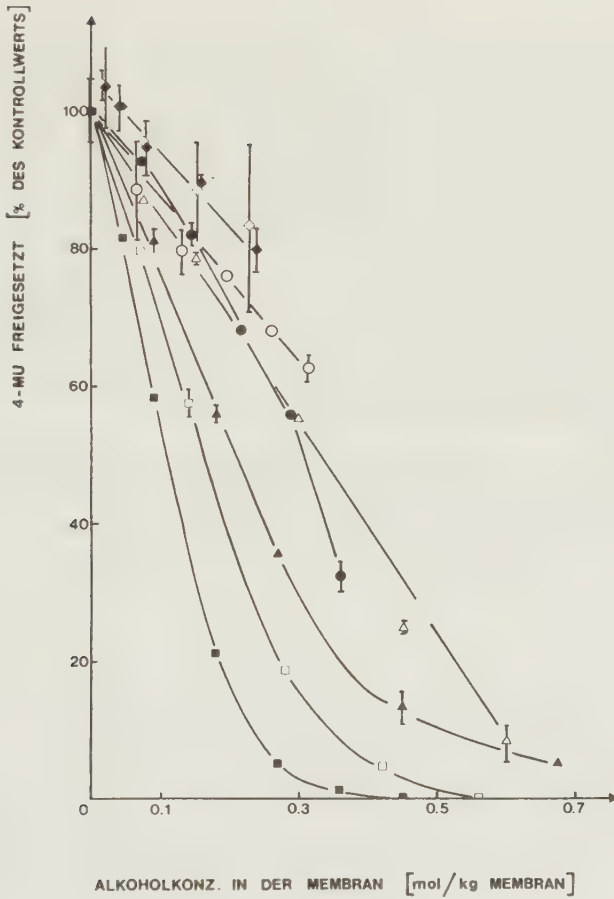


Abb. 39 b

Umsatz von 4-MU-NeuAc durch die membrangebundene Sialidase in Gegenwart verschiedener Konzentrationen der primären Alkohole Methanol bis n-Octanol

Es sind unter Beibehaltung der Symbole die gleichen Daten wie in Abb. 39 a dargestellt, doch wurden die auf das Ansatzvolumen bezogenen Alkoholkonzentrationen anhand der Membran/Puffer-Verteilungskoeffizienten ($\bar{U}$ 230) in Membrankonzentrationen umgerechnet.

Zusammengefaßt ergibt sich damit folgendes Bild: Die primären Alkohole inaktivieren die Sialidase selbst (sichtbar vor allem am Umsatz von 4-MU-NeuAc), wobei ihre Potenz mit der Kettenlänge abnimmt. Im Fall des Gangliosidabbaus überwiegt bei den kurzkettigen Alkoholen diese Inaktivierung, bei den höheren Alkoholen wird sie jedoch weit überkompensiert durch das verbesserte Substratangebot aufgrund der erleichterten Lateraldiffusion. Insoweit stimmen die experimentellen Ergebnisse ausgezeichnet mit dem entworfenen Modell überein.

Trotzdem wurden noch zusätzliche Kontrollexperimente durchgeführt, um diese Interpretationen zu untermauern. Sie sollen erst abgehandelt werden, bevor dann die weiteren Untersuchungen zum Einfluß der Membranfluidität auf die Kinetik der sialidasekatalysierten Substratspaltung folgen.

Reversibilität der fluiditätsbedingten Stimulierung des Gangliosidabbaus

Wenn die beobachtete Stimulierung des Gangliosidumsatzes wirklich nur auf einer Fluidisierung der mikrosomalen Membranen beruht, so sollte sie durch Entfernen des fluidisierenden Agens aus den Membranen auch wieder aufgehoben werden können. Ein solcher Versuch läßt sich sehr einfach mit dem Anästhetikum Lachgas (N_2O) durchführen, das in der vorliegenden Arbeit zwar nur gelegentlich, in unserem Arbeitskreis früher aber sehr häufig für Studien der membrangebundenen Sialidase eingesetzt wurde (207, 208, 175, 214). Es konnte gezeigt werden, daß dieses Gas tatsächlich die Viskosität mikrosomaler Membranen in reversibler Weise erniedrigt (214, zur Wirkung von N_2O auf Lipidphasen vgl. auch 145). Mikrosomale Membranen wurden daher in Abwesenheit von Substrat ohne und mit Lachgas vorinkubiert, das Gas wieder abgelassen und anschließend die Sialidaseaktivität gegenüber den Substraten 4-MU-NeuAc und Gangliosid G_{D1a} bestimmt (Tab. 12). Die Vorinkubation in Gegenwart von Lachgas ließ die Umsatzgeschwindigkeiten im Rahmen der Meßgenauigkeit völlig unverändert und führte vor allem nicht zu der starken Beschleunigung des Gangliosidabbaus, die man bei Gegenwart von Lachgas während des enzymatischen Tests beobachtete (bezüglich der allgemein nach einer Vorinkubation auftretenden leichten Steigerung der Sialidaseaktivität vgl. Kapitel 2.2.).

Der Umsatz von 4-MU-NeuAc wurde durch erhöhten Lachgasdruck gehemmt (vgl. 208: gleiches Ergebnis mit dem Substrat Sialyllactit), doch scheint hier - im Unterschied zu den Alkoholen - keine irreversible Inaktivierung der Sialidase eingetreten zu sein, zumindest nicht unter den Bedingungen

Tab. 12

Einfluß einer Vorinkubation mikrosomaler Membranen unter erhöhtem Lachgasdruck auf den Substratumsatz durch die membrangebundene Sialidase.

Mikrosomale Membranen (M.E) in 0.5 mM Tris/HCl-Puffer pH 7.2 wurden unter den angegebenen Bedingungen vorinkubiert, gegebenenfalls im Autoklaven (207) unter einem Lachgasdruck von 30 atm. Der Testansatz für die darauf folgende Bestimmung der Sialidaseaktivität enthielt in 0.1 ml Endvolumen 100 µg mikrosomales Protein, 0.2 mM 4-MU-NeuAc bzw. 0.1 mM [³H]-Gangliosid G_{D1a}, 50 mM Formiatpuffer pH 3.6 und NaCl entsprechend einer Endionenstärke von 150 mM. Nach halbstündiger Inkubation bei 37° C, gegebenenfalls im Autoklaven unter einem Lachgasdruck von 30 atm, wurde der Substratumsatz fluorimetrisch bzw. radiometrisch ermittelt (s. Abschnitt 6.3.1. und 6.3.3.).

Die Umsatzraten, Mittelwerte von Doppelbestimmungen, sind unter Angabe der Standardabweichungen in $\frac{\text{nmol}}{\text{h} \cdot \text{mg}}$ aufgeführt.

Bedingungen der Vorinkubation	Abbau von 4-MU-NeuAc		Abbau von Gangliosid G _{D1a}	
	unter Lachgas		unter Lachgas	
1 h 0° C	16.5 ± 0.2	6.2 ± 0.1	26.5 ± 0.1	60.5 ± 2.8
1 h 37° C	17.1 ± 0.1	6.6 ± 0.2	31.2 ± 0.1	67.6 ± 1.5
1 h 37° C/30 atm Lachgas	16.9 ± 0.3	6.1 ± 0.1	31.1 ± 0.5	59.4 ± 2.5

der Vorinkubation. Eine Ermittlung der enzymkinetischen Konstanten für die 4-MU-NeuAc-Spaltung unter den Bedingungen von Tab. 12 ergab in Abwesenheit von Lachgas für K_M einen Wert von 0.84 mM und für V_{max} von 64 $\frac{\text{nmol}}{\text{h} \cdot \text{mg}}$, unter 30 atm Lachgas dagegen Werte von 2.33 mM bzw. ebenfalls 64 $\frac{\text{nmol}}{\text{h} \cdot \text{mg}}$. Lachgas hemmt somit den Umsatz über eine Erniedrigung der Affinität der Sialidase zum wasserlöslichen Substrat. Auf das diesbezüglich andere Verhalten der Alkohole wird im übernächsten Abschnitt einzugehen sein.

Die Frage, ob die stimulierende Wirkung der Alkohole auf den Gangliosidumsatz ebenso reversibel ist wie die von Lachgas, läßt sich nicht so einfach beantworten, da sich die Alkohole nicht so ohne Schwierigkeiten aus dem Ansatz entfernen lassen wie ein Gas. Doch ermöglicht es die in Abschnitt 4.2. festgestellte Unabhängigkeit der Abbaurate vom Ansatzvolumen, durch Verdünnen des Ansatzes die Alkoholkonzentration wenigstens zum Teil nachträglich abzusenken. Tab. 13 zeigt am Beispiel von n-Hexanol, daß es bei gleicher Versuchsführung wie in Abschnitt 4.2. im Rahmen der Meßgenauigkeit völlig gleichgültig war, ob die Verdünnung mit hexanolhaltigem oder hexanol-

Tab. 13

Abbau von Gangliosid G_{D1a} durch die membrangebundene Sialidase in Gegenwart von n-Hexanol bei steigendem Ansatzvolumen

Der Grundansatz (achtfach) enthielt je 0.1 ml 100 μ g mikrosomales Protein (M.E.), 0.1 mM [3H]-Gangliosid G_{D1a} , 50 mM Formiatpuffer pH 3.6, NaCl entsprechend einer Endionenstärke von 150 mM und 24 mM n-Hexanol (zuge setzt in Form der gesättigten wässrigen Lösung). Nach halbstündiger Inkubation bei 37° C wurde der Ansatz auf Eis gekühlt. Es wurden ihm sieben Aliquots zu 100 μ l entnommen und im Rest radiometrisch der relative Gangliosidabbau ermittelt (s. Abschnitt 6.3.3.). Die Aliquots wurden mit Inkubationspuffer (50 mM Formiatpuffer pH 3.6, Ionenstärke 150 mM), der gegebenenfalls 24 mM n-Hexanol enthielt, auf das in der Tabelle angegebene Volumen verdünnt und erneut 30 min bei 37° C inkubiert. Anschließend wurde wieder radiometrisch der relative Gangliosidabbau ermittelt.

Der relative Gangliosidabbau, Mittelwerte aus Doppelbestimmungen (d.h. zwei Grundansätze mit paralleler Versuchsführung), ist in % vom eingesetzten Gangliosid ausgedrückt; die Standardabweichungen sind angegeben.

Ansatzvolumen	Ohne Verdünnung	Verdünnung mit Inkubationspuffer	
		ohne Hexanol	mit Hexanol
1. Inkubation			
0.1 ml	28.9 $\pm$ 0.2		
2. Inkubation			
0.1 ml	54.8 $\pm$ 1.8		
0.2 ml		54.0 $\pm$ 0.6	53.3 $\pm$ 1.0
0.4 ml		53.6 $\pm$ 1.3	52.9 $\pm$ 0.3
0.8 ml		50.4 $\pm$ 0.1	52.2 $\pm$ 1.9

freiem Inkubationspuffer erfolgte (Vergleichswert aus Abb. 33, Abschnitt 4.2.: bei sonst gleichen Inkubationsbedingungen betrug die Differenz zwischen 1. und 2. Inkubation in Abwesenheit von Hexanol nur 12.7 %). Sollte dies bedeuten, daß der erhöhte Gangliosidumsatz in Gegenwart von Alkoholen doch nicht auf einer geringeren Membranviskosität beruht, sondern vielleicht - trotz der Schlußfolgerungen von Abschnitt 4.1. - ausschließlich auf einem schnelleren Gangliosideinbau in die mikrosomalen Membranen, der dann ja selbstverständlich durch Alkoholentzug nicht mehr rückgängig zu machen war ?

Um darauf eine Antwort zu geben, wurden mikrosomale Membranen ohne Substratzusatz unter ansonsten normalen Testbedingungen verschiedene Zeiten in Gegenwart von 24 mM n-Hexanol vorinkubiert und anschließend durch Zugabe

von Gangliosid G_{D1a} die enzymatische Reaktion gestartet, unter gleichzeitiger Herabsetzung der Hexanolkonzentration auf 6 mM. Zum Vergleich wurde der Abbau in nicht vorinkubierten Kontrollansätzen mit 0, 6 und 24 mM n-Hexanol gemessen. Abb. 40 faßt die Ergebnisse zusammen. Die schraffierten Säulen zeigen, daß ohne Vorinkubation die Umsatzrate so zwischen der für 0 und 24 mM Hexanol lag, wie es dem Gehalt von 6 mM Hexanol entspricht, nach 15 min Vorinkubation jedoch in der Mitte zwischen der für 6 mM Hexanol (nach wie vor die eigentliche Ansatzkonzentration) und der für 24 mM Hexanol (Konzentration während der Vorinkubation). Daraus folgt, daß die mikrosomalen Membranen während der Vorinkubation eine Veränderung erleiden, die im Rahmen der eingehaltenen Inkubationszeiten zum großen Teil irreversibel ist und als deren Folge anschließend die Gangliosidspaltung beschleunigt ist.

Bei Vorinkubationszeiten über 15 min wurde die Sialidase dann sehr rasch inaktiviert, ganz im Widerspruch zu den Daten in Tab. 13, wonach der Gangliosidabbau während der 2. Inkubation nahezu genauso schnell erfolgte wie während der 1. Inkubation. Bei den letztgenannten Inkubationen war aber im Unterschied zu den Bedingungen während der Vorinkubation immer Gangliosidsubstrat anwesend, das die Sialidase möglicherweise stabilisieren kann, wie das nach ähnlichen Beobachtungen schon in Abschnitt 2.2.3. diskutiert wurde. Eventuell ist bereits dem nach einer Vorinkubation von 15 min ermittelten Umsatz eine Inaktivierung überlagert, so daß der irreversible Charakter der Stimulierung durch Hexanol sogar noch unterbewertet wurde. Auf jeden Fall aber tritt die irreversible Veränderung an Membran und/oder Sialidase auch in Abwesenheit von Gangliosid G_{D1a} auf und steht daher nicht unmittelbar mit seinem Einbau in Zusammenhang. Der durchweg hemmende Einfluß der Alkohole auf den sialidasekatalysierten Umsatz von 4-MU-NeuAc (Abb. 39) läßt die Sialidase selbst als Angriffspunkt dieser stimulierenden Veränderung kaum in Betracht kommen. Eher scheint die Fluidisierung der Membran ein nicht oder nur langsam reversibler Prozeß zu sein, ob nun aufgrund spezieller Membraneigenschaften oder wegen einer langsamen Rückdiffusion des Hexanols in die wässrige Phase, muß offen bleiben.

Abbau endogenen Gangliosids bei erhöhter Membranfluidität

Obwohl es der zuletzt beschriebene Versuch recht unwahrscheinlich macht, daß der Gangliosideinbau bei der fluiditätsbedingten Umsatzsteigerung eine ausschlaggebende Rolle spielt, wurde ein Weg gesucht, dies zweifels-

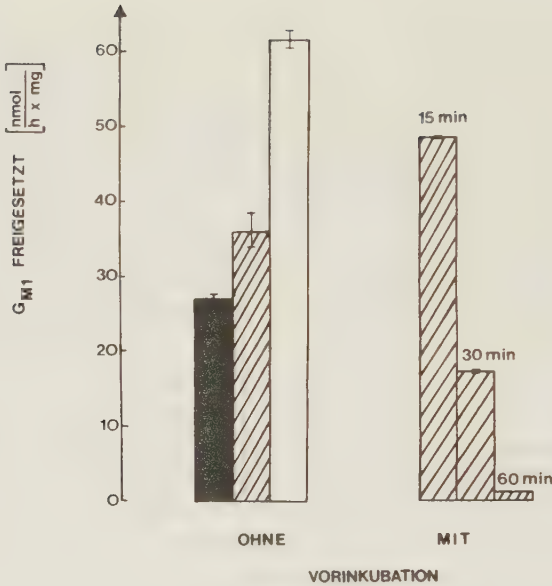


Abb. 40

Einfluß einer Vorinkubation mikrosomaler Membranen in Gegenwart von n-Hexanol auf den Gangliosidumsatz durch die membrangebundene Sialidase

Mikrosomale Membranen (M.E) wurden in Gegenwart von 50 mM Formiatpuffer pH 3.6, NaCl entsprechend einer Endionenstärke von 150 mM und 24 mM n-Hexanol (zuge setzt in Form der gesättigten wässrigen Lösung) die angegebenen Zeiten bei 37° C vorinkubiert. Der Testansatz für die darauf folgende Bestimmung der Sialidaseaktivität enthielt in 0.1 ml Endvolumen 100 µg mikrosomales Protein, 0.1 mM [³H]-Gangliosid G_{M1}, 50 mM Formiatpuffer pH 3.6, NaCl entsprechend einer Endionenstärke von 150 mM und 6 mM n-Hexanol. Die nicht vorinkubierten Vergleichsansätze hatten die gleiche Zusammensetzung, mit Ausnahme der Konzentration an n-Hexanol, die der Zeichenerklärung zu entnehmen ist. Nach halbstündiger Inkubation der Ansätze bei 37° C wurde der Gangliosidumsatz radiometrisch ermittelt (s. Abschnitt 6.3.3.). Angegeben sind die Mittelwerte von Doppelbestimmungen, die Standardabweichungen sind eingezeichnet.

 ohne n-Hexanol
  6 mM n-Hexanol
  24 mM n-Hexanol

frei zu belegen. Die einzige und gleichzeitig physiologisch bedeutsamste Möglichkeit dafür besteht darin, den Einfluß der Alkohole auf den Abbau der bereits von Natur aus in den mikrosomalen Membranen enthaltenen endogenen Ganglioside zu untersuchen (vgl. Abschnitt 2.3.1.). Wegen der aufwendigen Versuchsführung wurde dies wiederum nur beispielhaft für n-Hexanol durchgeführt. Um möglichst natürliche Bedingungen zu wählen, wurden mikrosomale Membranen verwendet, die nach ihrer Präparation noch nicht eingefroren, sondern nur auf Eis aufbewahrt worden waren. Wie aus Abb.41 ersichtlich, wurde der Umsatz endogenen Gangliosids G_{D1a} in Gegenwart von 24 mM n-Hexanol um ein Vielfaches beschleunigt, so daß bereits nach 20 min bei 37° C fast 90 % des Substrats verbraucht waren. Legt man einen Gangliosidgehalt der mikrosomalen Membranen von 20 nmol je mg Protein zugrunde (s. Abschnitt 2.3.1.), so lassen sich aus den Daten für 30 bzw. 10 min Inkubationszeit folgende Umsatzgeschwindigkeiten berechnen: $4.1 \frac{\text{nmol}}{\text{h} \cdot \text{mg}}$ in Abwesenheit von Hexanol und $42 \frac{\text{nmol}}{\text{h} \cdot \text{mg}}$ in Gegenwart von 24 mM Hexanol. Wurde den gleichen mikrosomalen Membranen soviel [^3H]-Gangliosid G_{D1a} zugesetzt, daß der davon in die Membranen inserierte Anteil dem endogenen Gehalt entsprach, so wurde dieser Anteil unter ansonsten gleichen Inkubationsbedingungen mit den Geschwindigkeiten 4.2 bzw. 26.4 $\frac{\text{nmol}}{\text{h} \cdot \text{mg}}$ gespalten (gleiche Versuchsführung wie in Abschnitt 2.3.5. und 4.1.). Berücksichtigt man, daß das markierte Gangliosid mit dem endogenen in Konkurrenz stand, sowie die unterschiedlichen enzymkinetischen Parameter in Ab- und Anwesenheit von Hexanol (vgl. Abschnitt 4.1. und 4.4.4.), so ergibt eine überschlagsmäßige Berechnung unter der Annahme, daß endogenes und inseriertes Gangliosid für die Sialidase nicht unterscheidbar sind, eine ausgezeichnete Übereinstimmung der gemessenen Werte mit der Theorie.

Diese Ergebnisse zeigen nicht nur eindeutig, daß der Umsatz endogenen Gangliosids in nativen Membranen durch die membrangebundene Sialidase in Gegenwart des membranfluidisierenden Alkohols n-Hexanol beschleunigt wird, sondern obendrein, daß die unter Berücksichtigung des Einbaus gewonnenen Ergebnisse mit exogenem [^3H]-Gangliosid die natürlichen Verhältnisse sehr gut wiedergeben. Obwohl dies nur stichprobenartig am Beispiel des n-Hexanols untersucht und bei den Daten von Abb. 38 der Gangliosideinbau nicht berücksichtigt wurde (vgl. aber Abb. 32 in Abschnitt 4.1.), erscheint damit sicher gestellt, daß die dort gezeigte Stimulierung des sialidasekatalysierten Gangliosidabbaus zumindest nicht in erster Linie auf einen beschleunigten

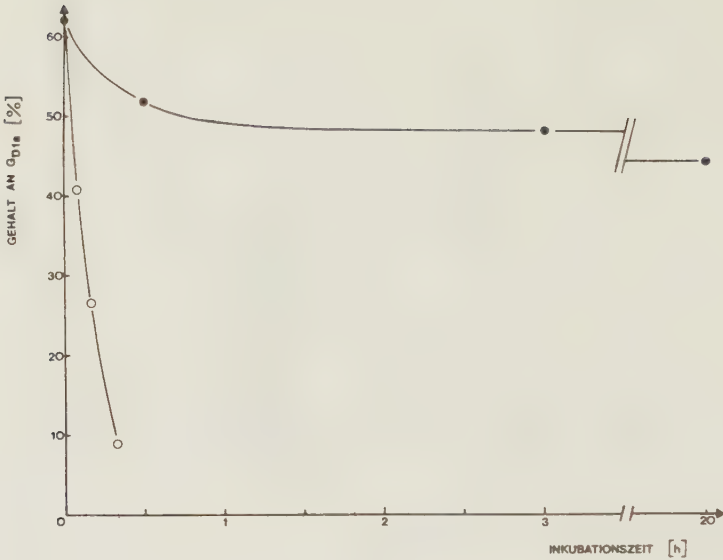


Abb. 41

Zeitabhängigkeit des Abbaus endogenen Gangliosids G_{D1a} durch die membrangebundene Sialidase bei unterschiedlicher Membranfluidität

0.5 ml Ansatz enthielten 500 µg mikrosomales Protein (M.G. frisch präpariert), 50 mM Formiatpuffer pH 3.6 und NaCl entsprechend einer Gesamtionenstärke von 150 mM, sowie gegebenenfalls 24 mM n-Hexanol (zuge setzt in Form der gesättigten wässrigen Lösung). Nach verschieden langer Inkubation bei 37° C wurden aus den mikrosomalen Membranen die Ganglioside isoliert und nach Dünnschichtchromatographie densitometrisch quantifiziert (s. Abschnitt 6.3.5.). Aufgetragen ist der prozentuale Anteil von Gangliosid G_{D1a} am Gesamtgangliosidgehalt der mikrosomalen Membranen.

- Ohne Hexanol
- Mit 24 mM Hexanol

Substrateinbau zurückgeht, sondern auf eine gesteigerte Membranfluidität und eine damit gekoppelte erleichterte Lateraldiffusion des Gangliosidsubstrats, auch wenn die Untersuchungen zur Reversibilität der Effekte noch Rätsel aufgeben, was sich eigentlich hinter der "Membranfluidität" wirklich verbirgt. Nach diesen Resultaten der Kontrollexperimente wird nun die Frage aktuell, ob sich Membranfluidität und Gangliosidumsatz womöglich nicht nur qualitativ, sondern auch quantitativ miteinander korrelieren lassen.

4.4.3. Korrelation zwischen Gangliosidumsatz und Membranfluidität

In den beiden vorausgehenden Abschnitten war festgestellt worden, daß die Reihe der primären Alkohole, insbesondere die Vertreter mit mehr als vier Kohlenstoffatomen, sowohl die Viskosität mikrosomaler Membranen herabsetzen, wie sie anhand der Fluoreszenzdepolarisation gemessen wird, als auch den von der membrangebundenen Sialidase katalysierten Abbau von Gangliosid G_{D1a} beschleunigen. Wenn für die Stimulierung des Abbaus keine speziellen Effekte der Alkohole, sondern nur die als Folge der geringeren Membranviskosität erleichterte Lateraldiffusion verantwortlich sind, sollte sich eine quantitative Korrelation zwischen der Fluidität und dem Gangliosidumsatz aufstellen lassen, d.h. bei gleicher Membranfluidität sollte der Umsatz gleich schnell erfolgen, unabhängig davon, welche Konzentration welchen Alkohols die Fluidisierung bewirkte. Wie Abb. 42 zeigt, erfüllen die in Gegenwart der Alkohole n-Pentanol bis n-Octanol ermittelten Meßwerte diese Forderung im Rahmen der Meßgenauigkeit recht gut. Die kurzkettigen Alkohole dagegen inhibieren besonders in höheren Konzentrationen die Sialidase, wie schon im vorhergehenden Abschnitt diskutiert, und fallen daher aus einer solchen Korrelation heraus. Auch andere Arbeitsgruppen (Ü 101) haben berichtet, daß die ersten vier Glieder der homologen Reihe der 1-Alkanole bezüglich ihres Einflusses auf Lipidmembranen eine eigene Gruppe bilden, die sich von den höheren Gliedern unterscheidet.

Interessanterweise wurde in Abb. 42 eine näherungsweise lineare Korrelation zwischen Membranfluidität und Umsatzgeschwindigkeit erhalten. Eine Zunahme von $\frac{1}{\eta} - \frac{1}{\eta_0}$ um 0.1 Einheit, was nach Gl. 22 aus Abschnitt 6.6.1. einer Erhöhung der "Mikrofluidität" um 0.023 Poise^{-1} entspricht, stimulierte den sialidasekatalysierten Gangliosidabbau um ca. 12 %. Nach den

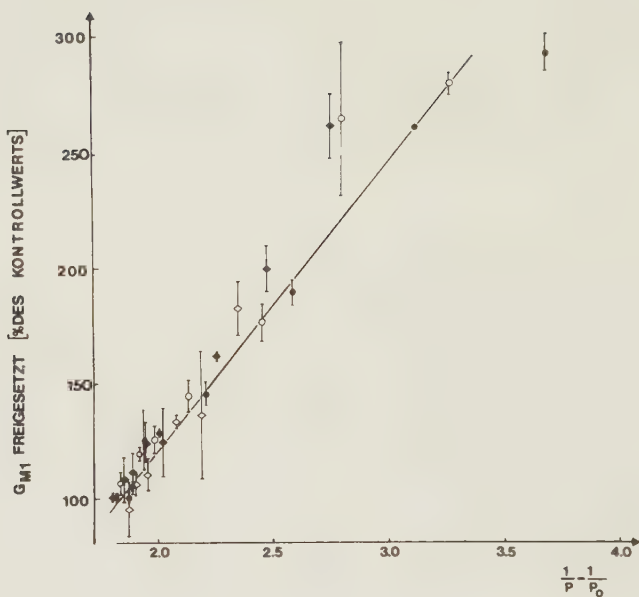


Abb. 42

Korrelation des Umsatzes von Gangliosid G_{D1a} durch die membrangebundene Sialidase mit der Membranfluidität

Die in Gegenwart verschiedener Konzentrationen der primären Alkohole n-Pentanol bis n-Octanol bestimmten Umsatzraten für Gangliosid G_{D1a} aus Abb. 38 sind gegen die bei den jeweils gleichen Konzentrationen der gleichen Alkohole gemessenen Membranfluiditäten, repräsentiert durch den Ausdruck $\frac{1}{P} - \frac{1}{P_0}$, aus Abb. 37 aufgetragen. Beide Größen sind jeweils die Mittelwerte aus drei Bestimmungen, die Standardabweichungen für den Gangliosidumsatz sind eingezeichnet.

- n-Pentanol
- ◆ n-Heptanol
- n-Hexanol
- ◇ n-Octanol

theoretischen Überlegungen in Abschnitt 3.4. war nicht unbedingt eine lineare Abhängigkeit der Gesamtreaktionsgeschwindigkeit von der Fluidität zu erwarten, doch läßt sich darüber erst genaueres sagen, wenn man die Relation der im enzymatischen Test eingesetzten Gangliosidkonzentration zur Michaelis-Konstante kennt.

4.4.4. Abhängigkeit der Michaelis-Konstanten für den sialidasekatalysierten Substratumsatz von der Membranfluidität

Die im vorausgehenden Abschnitt festgestellte enge Korrelation zwischen der Fluidität der mikrosomalen Membranen und dem Gangliosidabbau durch die membrangebundene Sialidase sollte, gemäß der in Abschnitt 3.4. erläuterten Theorie, vom Standpunkt der Kinetik aus betrachtet auf einem Absinken der Michaelis-Konstante der enzymatischen Reaktion mit abnehmender Membranviskosität beruhen. Die in Gegenwart verschiedener Konzentrationen an Hexanol bestimmten Werte für K_M sind in Tab. 14 aufgeführt, zusammen mit den entsprechenden Werten für die Spaltung von 4-MU-NeuAc. Wie von der Theorie gefordert, nahmen die Michaelis-Konstanten für den Gangliosidumsatz mit steigender Hexanolkonzentration stark ab, während sich diejenigen für den Abbau von 4-MU-NeuAc im Rahmen ihrer Zuverlässigkeit nicht systematisch veränderten und eine gleichbleibende Affinität der Sialidase selbst zu ihren Substraten nahelegen. Die gerade noch signifikante Abnahme der Maximalgeschwindigkeiten für die 4-MU-NeuAc-Spaltung mit zunehmender Hexanolkonzentration spiegelt die bereits mehrfach besprochene Inaktivierung der Sialidase durch den Alkohol wider, da in den Wert für V_{max} ja gemäß $V_{max} = k_2[E]$ die Konzentration an aktivem Enzym eingeht.

In Abschnitt 3.4. wurde eine Proportionalität zwischen der Membranfluidität $\frac{1}{\eta}$ und dem Kehrwert $\frac{1}{K_M}$ der Michaelis-Konstante postuliert, die von den Werten aus Tab. 14 zusammen mit den Daten aus Abb. 37 (Abschnitt 4.4.1.) tatsächlich ausgezeichnet erfüllt wird (Abb. 43). Die exakte Linearität der Korrelation muß geradezu überraschen, berücksichtigt man zum einen die vielen Annahmen, die hinter dem Konzept der Messung von Membranfluiditäten mit Hilfe der Fluoreszenzdepolarisation stehen (s. Abschnitt 6.6.1.), und zum andern die vielen Faktoren, die die exakte Bestimmung enzymkinetischer Parameter für den sialidasekatalysierten Gangliosidabbau erschweren, wie etwa den Einfluß des Gangliosideinbaus in die Membranen, die Instabili-

Tab. 14

Michaelis-Konstanten K_M und Maximalgeschwindigkeiten $V_{\max}$ für die Spaltung von Gangliosid G_{D1a} und 4-MU-NeuAc durch die membrangebundene Sialidase in Gegenwart verschiedener Konzentrationen an n-Hexanol

0.1 ml Ansatz (jeweils Doppelbestimmungen) enthielten 100 µg mikrosomales Protein (M.8), verschiedene Konzentrationen an [3H]-Gangliosid G_{D1a} bzw. 4-MU-NeuAc, 50 mM Formiatpuffer pH 3.6, NaCl entsprechend einer Ionenstärke von 150 mM und die angegebenen Konzentrationen an n-Hexanol (zuge setzt in Form der gegebenenfalls gesättigten, wässrigen Lösung). Nach halbstündiger (Gangliosid als Substrat) bzw. einstündiger (4-MU-NeuAc als Substrat) Inkubation bei 37° C wurde der Substratumsatz radiometrisch bzw. fluorimetrisch ermittelt (s. Abschnitt 6.3.3. und 6.3.1.). Aus der so für jede Hexanolkonzentration erhaltenen Substratabhängigkeit wurden anhand verschiedener Verfahren zur Kurvenanpassung Werte für K_M und $V_{\max}$ berechnet. Mit 4-MU-NeuAc als Substrat wurden diese Werte gemittelt und sind zusammen mit der Streuung aufgrund der verschiedenen Rechenverfahren in der Tabelle aufgeführt. Mit Gangliosid G_{D1a} als Substrat wurden bei erhöhter Membranfluidität zum Teil recht hohe Werte für den relativen Abbau erhalten, so daß nur mehr eine Berücksichtigung der Anpassung an die zeitintegrierte Michaelis-Menten-Gleichung gerechtfertigt erschien (zu den Berechnungen und Kriterien s. Abschnitt 6.3.6., insbesondere Abschnitt 6.3.6.2.).

Konzentration an n-Hexanol [mM]	Abbau von Gangliosid G_{D1a}		Abbau von 4-MU-NeuAc	
	K_M [nM]	$V_{\max}$ [nmol h·mg]	K_M [nM]	$V_{\max}$ [nmol h·mg]
0	0.12 ± 0.01	27 ± 1	0.98 ± 0.18	40 ± 7
6	0.064	32	-	-
12	0.041	49	0.98 ± 0.11	31 ± 2
24	0.022	64	0.97 ± 0.25	24 ± 4

tät der Sialidase unter den Inkubationsbedingungen, oder die bei hohen Gangliosidkonzentrationen auftretende Hemmung des Umsatzes (s. Abschnitt 2.3.3., vgl. auch Abschnitt 6.3.6.). Im übrigen sei hier noch erwähnt, daß in Zusammenarbeit mit E. Acevedo unter Verwendung synaptischer Plasmamembranen als Enzymquelle eine qualitativ ähnliche Abnahme der scheinbaren Michaelis-Konstante mit steigender Membranfluidität beobachtet werden konnte (215), obgleich dabei eine wesentlich ausgeprägtere Substrathemmung auftrat, die die Verlässlichkeit der Werte stärker einschränkte.

Nachdem nun die Abhängigkeit der Michaelis-Konstante von der Membranfluidität bekannt ist, kann jetzt auch der lineare Verlauf der im vorhergehenden Abschnitt gezeigten Korrelation (Abb. 42) zwischen Gangliosidumsatz und

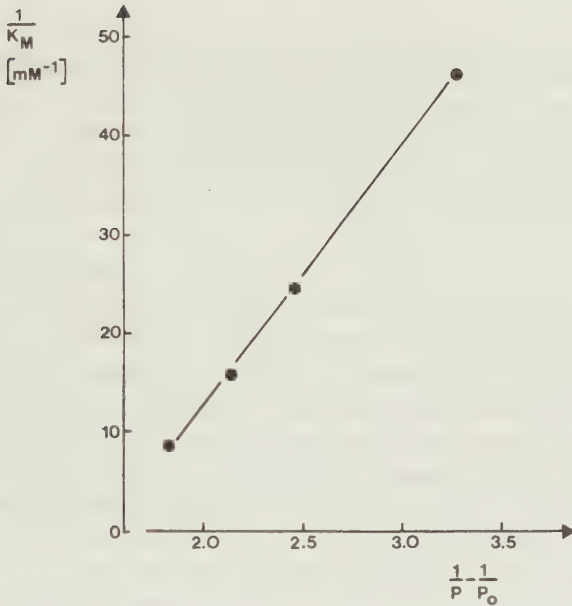


Abb. 43

Abhängigkeit der Michaelis-Konstante K_M für die Gangliosidspaltung durch die membrangebundene Sialidase von der Membranfluidität

Die Kehrwerte der in Gegenwart verschiedener Konzentrationen an n-Hexanol bestimmten Michaelis-Konstanten für den Gangliosidabbau aus Tab. 14 sind gegen die bei den gleichen Hexanolkonzentrationen gemessenen Werte für die Membranfluidität, repräsentiert durch den Ausdruck $\frac{1}{P} - \frac{1}{P_0}$, aus Abb. 37 aufgetragen.

Fluidität genauer analysiert werden. Für die Umsatzgeschwindigkeit V gilt nach Michaelis und Menten (155, 18)

$$V = V_{\max} \frac{[S]}{K_M + [S]}$$

wobei nun K_M nach Abschnitt 3.4. und 6.6.1., sowie nach Abb. 43 eine Funktion der Membranfluidität darstellt:

$$\frac{1}{K_M} \sim \frac{1}{P} \sim \left(\frac{1}{P} - \frac{1}{P_0} \right)$$

Bei konstanter Substratkonzentration $[S]$ folgt aus diesen Gleichungen ein hyperboler Verlauf für die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit V von der Membranfluidität, ganz ähnlich dem einer gewöhnlichen Substratab-

hängigkeit. Bei sehr kleiner Fluidität ist K_M groß und $[S]$ im Nenner der Michaelis-Menten-Gleichung kann vernachlässigt werden. V steigt dann linear mit $\frac{1}{K_M}$ und damit auch mit der Fluidität an. Ist die Fluidität dagegen sehr groß, wird K_M sehr klein und kann nun seinerseits im Nenner vernachlässigt werden, so daß sich V dem Grenzwert $V_{\max}$ nähert. Nimmt bei einer bestimmten Fluidität K_M den Wert von $[S]$ an, so erfolgt die Umsetzung mit halbmaximaler Geschwindigkeit.

Bei den Versuchen, deren Ergebnisse in Abb. 42 zusammengefaßt sind, betrug die Gangliosidkonzentration im Ansatz 0.1 mM, während die Werte für K_M nach Tab. 14 bzw. Abb. 43 je nach Fluidität der mikrosomalen Membranen den Bereich 0.02 bis 0.12 mM, also $K_M \leq [S]$, überstrichen. Dementsprechend sollten sich die Werte für V zwischen $\frac{1}{2} V_{\max}$ und $\frac{5}{6} V_{\max}$ bewegen und die Korrelation in Abb. 42 müßte einen stark gekrümmten Verlauf aufweisen. Daß dem nicht so ist, rührt davon her, daß mit zunehmender Membranfluidität nicht nur die Michaelis-Konstante für den Gangliosidumsatz absank, sondern auch $V_{\max}$ erheblich anstieg (s. Tab. 14). Damit beruht die alkoholinduzierte Stimulierung des sialidasekatalysierten Umsatzes von Gangliosid G_{D1a} offensichtlich auf zwei Effekten:

- 1) gemäß der in Kapitel 3. entwickelten Theorie auf einer beschleunigten Lateraldiffusion und - im Fall zugesetzten Gangliosids - zu einem Teil auch auf dessen beschleunigtem Einbau, was sich beides enzymkinetisch in einer Erniedrigung der scheinbaren Michaelis-Konstanten ausdrückt, und
- 2) auf einer Zunahme der Maximalgeschwindigkeit $V_{\max}$.

Abschließend läßt sich feststellen, daß die in Kapitel 3. ausgearbeitete Theorie zur Wechselwirkung der membrangebundenen Sialidase mit ihren Substraten, insbesondere dem Gangliosidsubstrat, in allen Punkten bestätigt wurde, daß aber auch Ergebnisse erhalten wurden, die innerhalb der Theorie nicht mehr zu deuten sind und über das Modell hinausweisen. Solchen Resultaten ist der letzte Abschnitt des experimentellen Teils dieser Arbeit gewidmet.

4.5. Einige Versuchsergebnisse, die über das Modell hinausweisen

Nicht alle der im Verlauf der Arbeit erhaltenen Ergebnisse lassen sich ohne weiteres in das in Kapitel 3. entworfene Modell einordnen. Sie sollen an dieser Stelle zusammengefaßt und durch einige weitere Befunde ergänzt werden.

1) Substrathemmung

Konzentrationen an Gangliosid G_{D1a} über 0.1 bis 0.2 mM hemmten seinen Abbau durch die membrangebundene Sialidase (vgl. Abschnitt 2.3.3.), je nach Membranpräparation, Inkubationsbedingungen und Vorbehandlung der mikrosomalen Membranen jedoch recht unterschiedlich. Ein Beispiel einer solchen Hemmung gibt die Substratabhängigkeit in Abb. 28 (Abschnitt 2.5.1.) bei Abwesenheit des Inhibitors. Mit wasserlöslichen Substraten bis zu Konzentrationen von 3 mM wurde dagegen nie eine eindeutige Substrathemmung beobachtet.

2) Stimulierung durch Vorinkubation

Eine Inkubation mikrosomaler Membranen bei neutralen bis schwach sauren pH-Werten vor dem enzymatischen Test erhöhte durchweg die nachfolgend gemessene Umsatzgeschwindigkeit für Gangliosid G_{D1a} , aber nur gelegentlich die für 4-MU-NeuAc (Abb. 6, 9 b, 10 und 12 in Kapitel 2.2., sowie Tab. 12 in Abschnitt 4.4.2.). Diese Stimulierung wurde u.a. spekulativ mit einem Abbau konkurrierender endogener Substrate während der Vorinkubation in Verbindung gebracht, doch kann eine solche Erklärung nicht voll befriedigen, da davon stets auch der Umsatz des wasserlöslichen Substrats hätte profitieren sollen.

3) Nicht reversibler Charakter der alkoholinduzierten Stimulierung

Die Kontrollversuche in Abschnitt 4.4.2. hatten ergeben (Tab. 13 und Abb. 40), daß die von Hexanol verursachte Veränderung der mikrosomalen Membranen, die zum beschleunigten Gangliosidumsatz führte, innerhalb von einigen 10 min nicht reversibel war, zumindest nicht in vollem Umfang.

4) Alkoholinduzierter Anstieg in V_{max} für die Gangliosidspaltung

Mit zunehmender Membranfluidität in Gegenwart von n-Hexanol nahm nicht nur

die Michaelis-Konstante für den Gangliosidabbau ab, sondern gleichzeitig auch die Maximalgeschwindigkeit zu, während $V_{\max}$ für die 4-MU-NeuAc-Spaltung eher abfiel (Tab. 14 des vorhergehenden Abschnitts). Die diesbezügliche Diskussion des Kurvenverlaufs in Abb. 42 legt nahe, daß für die anderen höheren Alkohole das gleiche gilt. Nach Tab. 9 in Abschnitt 4.1. erreichte $V_{\max}$ bei der höchsten eingesetzten Konzentration an Hexanol (24 mM) den gleichen Wert wie bei niedriger Ionenstärke von 23 mM und nicht erhöhter Membranfluidität (vgl. auch Tab. 15, s.u.).

Übrigens lassen sich auf der Grundlage dieser kinetischen Parameter die Daten von Abb. 23 in Abschnitt 2.4.3. zur unterschiedlichen Stimulierung des Gangliosidumsatzes bei verschiedenen Ionenstärken - zumindest qualitativ - recht gut deuten. Bei niedriger Ionenstärke ist $V_{\max}$ bereits auf seinem hohen "Endwert", und der Alkohol senkt nur noch K_M ab, der über 12 mM Hexanol bereits so niedrig liegt, daß die Sialidase mit Substrat nahezu gesättigt ist und auch eine weitere Absenkung der Fluidität keine Stimulierung mehr bewirken kann. Bei Ionenstärken über 100 mM dagegen hat $V_{\max}$ bei unbehandelten Membranen einen niedrigeren Wert, der dann mit zunehmender Fluidität auf den gleichen "Endwert" ansteigt und zusammen mit dem abnehmenden K_M eine in etwa proportionale Umsatzsteigerung mit der Hexanolkonzentration verursacht.

5) Einfluß von Lagern und Einfrieren mikrosomaler Membranen auf den Gangliosidumsatz

Frisch präparierte mikrosomale Membranen setzten Gangliosid G_{D1a} wesentlich langsamer um als die gleichen Membranen nach Einfrieren und Wiederauftauen (Tab. 2 in Abschnitt 2.2.1.). Mit wasserlöslichem Substrat ließ sich die gleiche Tendenz feststellen, doch mit viel geringeren Effekten. Diese Steigerung vor allem des Gangliosidabbaus durch den Einfriervorgang wurde mit allen Mikrosomenpräparationen beobachtet, die daraufhin untersucht wurden, wenn auch nicht immer in gleichem Ausmaß. Bei erhöhter Membranfluidität fiel sie deutlich geringer aus (Tab. 2). Auch für den Abbau endogenen Gangliosids durch die membrangebundene Sialidase wurden dieselben Resultate erzielt. So konnte die Sialidase der gleichen mikrosomalen Membranen deren Gehalt an endogenem Gangliosid G_{D1a} in frisch präpariertem Zustand um maximal 15 % verringern (Abb. 26 in Abschnitt 2.4.3.), nach Einfrieren jedoch schon nach 3 Stunden um 25 %, bevor dann der Abbau zum Er-

liegen kam (gemessen jeweils in Gegenwart physiologischer Ionenstärke bei gleicher Durchführung wie in Abb. 26 beschrieben).

Mehr Aufschluß über die dahinterstehenden Mechanismen sollte eine genauere Analyse der Reaktionskinetik bringen. Mit der bereits bei den Versuchen von Abschnitt 2.3.5. und 4.1. angewendeten Methode wurde der Anteil des in die mikrosomalen Membranen eingebauten [^3H]-Gangliosids G_{D1a} zusammen mit seinem Umsatz ermittelt, um daraus die kinetischen Konstanten zu berechnen. Die zeitraubende Versuchsführung ließ je Substratabhängigkeit nur wenige Meßpunkte zu, was zusammen mit sonstigen Abweichungen vom theoretischen Kurvenverlauf, wie z.B. Substrathemmung, eine große Ungenauigkeit der kinetischen Parameter mit sich brachte. Die anhand einer frischen Membranpräparation erhaltenen Werte sind in Tab. 15 aufgeführt, wobei nicht nur der Einfluß des Einfrierens, sondern auch der einer Lagerung auf Eis berücksichtigt wurde. Mit anderen Präparationen mikrosomaler Membranen wurden qualitativ ähnliche Resultate erhalten, die sich folgendermaßen zusammenfassen lassen:

Durch den Einfriervorgang stieg der bei physiologischer Ionenstärke bestimmte Wert für V_{max} an, während der aufgrund niedriger Ionenstärke oder geringer Membranviskosität bereits erhöhte Wert unbeeinflusst blieb. Die Michaelis-Konstante veränderte sich dabei meist nur wenig. Demgegenüber führte eine Lagerung uneingefrorener mikrosomaler Membranen bei 0°C in erster Linie zu einer Absenkung von K_M . Die Geschwindigkeiten für den Gangliosideinbau schienen weder durch Einfrieren noch durch Lagern signifikant verändert. Das gleiche gilt auch für die enzymkinetischen Konstanten für die 4-MU-NeuAc-Spaltung in Gegenwart physiologischer Ionenstärke, die in einem Fall parallel bestimmt wurden.

6) Einfluß von Lagern und Einfrieren auf die Fluidität mikrosomaler Membranen
Teilweise erinnern die durch Lagern und Einfrieren hervorgerufenen Effekte auf den Gangliosidumsatz an den Einfluß einer erhöhten Membranfluidität, die daher unter den gleichen Bedingungen anhand der Fluoreszenzdepolarisation gemessen wurde (Tab. 16). Doch verursachten weder der Einfriervorgang noch eine Lagerung auf Eis über fünf Wochen ein Ansteigen der Membranfluidität, sondern im Gegenteil eine leichte Verringerung.

Tab. 15

Einfluß von Lagerung, Einfrieren, Ionenstärke und Membranfluidität auf die enzymkinetischen Konstanten der Gangliosidspaltung durch die membrangebundene Sialidase

Mikrosomale Membranen (M.G) in 0.5 mM Tris/HCl-Puffer pH 7.2 wurden nach der Präparation entweder wie üblich sofort eingefroren und erst unmittelbar vor Versuchsbeginn wieder aufgetaut, oder aber uneingefroren die angegebene Zeit auf Eis gelagert. 0.1 ml Ansatz enthielten 100 µg mikrosomales Protein, verschiedene Konzentrationen an [^3H]-Gangliosid G_{D1a} , 50 mM Formiatpuffer pH 3.6, sowie gegebenenfalls NaCl entsprechend einer Endionenstärke von 150 mM und 24 mM n-Hexanol (zugesezt in Form der gesättigten wässrigen Lösung). Nach halbstündiger Inkubation bei 37° C wurden die Ansätze neutralisiert und in Gegenwart von 0.25 % Trypsin weitere 30 min bei 37° C inkubiert. Anschließend wurden die mikrosomalen Membranen abzentrifugiert und ihr Gehalt an [^3H]-Gangliosid G_{D1a} und G_{M1} radiometrisch ermittelt (zur genauen Durchführung vgl. Abschnitt 6.4.1.). Aus der so für jede der aufgeführten Bedingungen bestimmten Abhängigkeit des Gangliosidumsatzes von der Konzentration membrangebundenen Gangliosids wurden anhand verschiedener Verfahren zur Kurvenanpassung Werte für K_M und V_{max} berechnet. Soweit möglich sind die daraus gebildeten Mittelwerte zusammen mit der Streuung aufgrund der verschiedenen Rechenverfahren angegeben. Teilweise wurden jedoch so hohe Werte für den relativen Abbau erhalten, daß nur mehr eine Berücksichtigung der Anpassung an die zeitintegrierte Michaelis-Menten-Gleichung gerechtfertigt erschien (zu den Berechnungen und Kriterien s. Abschnitt 6.3.6., insbesondere Abschnitt 6.3.6.2.).

	23 mM Ionenstärke		150 mM Ionenstärke		150 mM Ionenstärke 24 mM n-Hexanol	
	K_M	V_{max}	K_M	V_{max}	K_M	V_{max}
	[mM]	$\left[\frac{\text{nmol}}{\text{h} \cdot \text{mg}}\right]$	[mM]	$\left[\frac{\text{nmol}}{\text{h} \cdot \text{mg}}\right]$	[mM]	$\left[\frac{\text{nmol}}{\text{h} \cdot \text{mg}}\right]$
Lagerung auf Eis						
2 Tage	0.24±0.04	110±13	0.16 ± 0.04	32 ± 6	0.016	64
16 Tage	0.05	58	0.043±0.006	20 ± 1	0.014	61
30 Tage	0.04	64	0.023±0.005	20 ± 2	0.005	68
Nach Einfrieren	0.13±0.02	92 ± 7	0.10 ± 0.06	44 ± 18	0.017	65

Betrachtet man alle diese, zum Teil zugegebenermaßen noch recht vorläufigen Resultate, so wird deutlich, daß der Abbau von Gangliosid G_{D1a} durch die membrangebundene Sialidase durch noch weit mehr Faktoren beeinflusst wird, als im Modell von Kapitel 3. angenommen, während der Umsatz des wasserlöslichen Substrats 4-MU-NeuAc in der Regel keine Besonderheiten erkennen läßt. Tatsächlich weiß man heute, daß biologische Membranen noch viel komplizierter aufgebaut sind als das im ursprünglichen Membranmodell des flüssigen Mosaiks mit seinen ungehindert lateral beweglichen Lipiden und Pro-

Tab. 16

Einfluß von Lagerung und Einfrieren auf die Fluidität mikrosomaler Membranen

Mikrosomale Membranen (M.G) in 0.5 mM Tris/HCl-Puffer pH 7.2 wurden nach der Präparation entweder uneingefroren auf Eis gelagert, oder eingefroren, wieder aufgetaut und dann die angegebenen Zeiten auf Eis gelagert.

2 ml Ansatz für die anschließende Messung der Fluoreszenzdepolarisation enthielten 1 mg mikrosomales Protein, 1 nmol DPH und 5 mM Tris/HCl-Puffer pH 7.2. Der Ansatz wurde in einer Fluoreszenzküvette 1 x 1 cm im Microviscosimeter 30 min bei 37° C inkubiert. Nach erfolgtem Einbau von DPH in die mikrosomalen Membranen wurde die Fluoreszenzdepolarisation P gemessen (vgl. Abschnitt 6.6.2.) und daraus der Wert für den Ausdruck $\frac{1}{P} - \frac{1}{P_0}$ (mit $P = 0.46$) berechnet, der nach Abschnitt 6.6.1. ein gutes Maß für die Membranfluidität darstellt⁰. Die aufgeführten Werte beruhen auf Einzelbestimmungen, doch wurde der Meßwert über längere Zeit verfolgt und die angegebenen Fehler beziehen sich auf die Stabilität des Meßwerts, also die Genauigkeit des Meßvorgangs selbst.

Lagerzeit auf Eis (Tage)	Membranfluidität, ausgedrückt durch $\frac{1}{P} - \frac{1}{P_0}$	
	uneingefroren	eingefroren gewesen
0	-	2.33 ± 0.02
3	2.70 ± 0.02	-
15	2.57 ± 0.04	2.31 ± 0.02
35	2.31 ± 0.04	1.94 ± 0.04

teinen zum Ausdruck kommt (vgl. Einleitung).

Auf diesem Hintergrund sollen hier noch einige Spekulationen zu obigen Ergebnissen angestellt werden. Angenommen, die mikrosomalen Membranen besitzen im nativen Zustand bei 37° C eine bestimmte Struktur, die gekennzeichnet ist durch eine hohe funktionelle Fernordnung (Einteilung in Kompartimente mit bestimmten Funktionen) und eine geringe Nahordnung (große Lipidbereiche im fluiden Zustand mit gemischter Lipid- und Proteinzusammensetzung). Bei der Präparation der mikrosomalen Membranen, verbunden mit einer schnellen Abkühlung auf 0 bis 4° C, wird diese Struktur konserviert. Zum enzymatischen Test wird wieder schnell auf 37° C erwärmt und die Membranen re-präsentieren den nativen Zustand. Lagert man jedoch die mikrosomalen Membranen bei niedrigen Temperaturen, entmischen sich langsam die Lipidphasen und manche Lipide kristallisieren aus (Clusterbildung), ohne daß die Fernordnung der Membran davon berührt wird. Membranlipide mit niedrigen Umwandlungstemperaturen sammeln sich zusammen mit den Membranproteinen in

fluiden Bereichen zwischen den Reinlipidclustern im Gelzustand. Erwärmt man nun auf 37° C, so mag die durchschnittliche Membranfluidität, gemessen anhand der Fluoreszenzdepolarisation, gleich geblieben oder noch wahrscheinlicher leicht erniedrigt sein ("Hysterese", vgl. 202), doch die verfügbaren Sialidasemoleküle haben sich in den fluiden Membranbereichen gesammelt, die nun den bevorzugten Ort des Gangliosideinbaus und auch den eigentlichen Reaktionsraum für den Gangliosidabbau darstellen. Da dieser Raum kleiner ist als die Gesamtoberfläche der Membran, fällt die scheinbare Michaelis-Konstante ebenfalls kleiner aus.

Im Unterschied zur Lagerung bewirkt der Einfriervorgang aufgrund der Kristallisation des Wassers ein vielfaches Zerreißen der Membranstruktur, ohne die Zusammensetzung und Nahordnung der einzelnen Bruchstücke zu verändern. Beim Erwärmen fusionieren die Bruchstücke dann zufällig, ohne die anfängliche Fernordnung der Membran wieder herzustellen. Befand sich ursprünglich ein Teil der Sialidasemoleküle in Membranbereichen, die für exogenes Gangliosid unzugänglich waren, so stehen sie nun alle für die enzymatische Reaktion zur Verfügung, und $V_{\max}$ erreicht einen höheren Wert. K_M aber bleibt wegen der unveränderten Nahordnung der Membranen konstant.

Weiter läßt sich spekulieren, daß die native Fernordnung der mikrosomalen Membranen nicht nur durch Einfrieren, sondern auch durch Erwärmen in Puffern niedriger Ionenstärke oder in Gegenwart hoher Konzentrationen membranfluidisierender Agentien aufgehoben wird, so daß unter diesen Bedingungen $V_{\max}$ unabhängig von der Vorgeschichte bereits den wirklich "maximalen" Wert annimmt. Auch der unter Punkt 2) erwähnte gesteigerte Gangliosidumsatz nach Vorinkubation der mikrosomalen Membranen bei neutralen pH-Werten und niedriger Ionenstärke ließe sich so als Folge einer Aufhebung der Kompartimentierung und einer Erhöhung der Anzahl der tatsächlich aktiven Sialidasemoleküle erklären. Bei mittleren Alkoholkonzentrationen hingegen steigt die verfügbare Sialidasemenge nur allmählich mit der Membranfluidität an, und $V_{\max}$ nimmt konzentrationsabhängig zu (Punkt 4). Daß eine solche Zerstörung der Membranfernordnung nicht ohne weiteres reversibel sein dürfte (vgl. Punkt 3), liegt auf der Hand, und selbst wenn die Erleichterung der lateralen Diffusion und damit die Absenkung von K_M durch Entzug des Alkohols rückgängig zu machen ist, bleibt doch der auf dem erhöhten Wert für $V_{\max}$ beruhende Anteil der Stimulierung erhalten.

Der Umsatz des wasserlöslichen Substrats 4-MU-NeuAc wird von all diesen spekulativen Veränderungen der mikrosomalen Membranstruktur nicht betroffen, da sich 4-MU-NeuAc der Sialidase direkt über die wässrige Phase nähern kann, mehr oder weniger unbehelligt von der Nah- oder Fernordnung der Membran.

Der einzige der zu Beginn dieses Abschnitts aufgeführten Befunde, der bisher noch nicht interpretiert wurde, betrifft die Substrathemmung (Punkt 1). Mit einer möglichen Kompartimentierung der Membranen kann sie kaum etwas zu tun haben, da sie selbst in Gegenwart von Triton X-100 aufzutreten scheint, wenn auch nur in sehr abgeschwächter Form (Abb. 28 in Abschnitt 2.5.1.) In der Literatur (256, 171) wurde sie mit dem Gleichgewicht zwischen Gangliosidmonomeren und Mizellen in Verbindung gebracht unter der Annahme, daß nur die Monomeren von der Sialidase als Substrate akzeptiert werden, die Mizellen aber auf unbekannte Weise hemmen. Da die kritische Mizellkonzentration wesentlich niedriger liegt als in diesen Arbeiten angenommen (vgl. Einleitung), dürfte eine solche Interpretation heute überholt sein, doch läßt sie sich vielleicht auf die Verhältnisse innerhalb der Membran übertragen. Die Gangliosidmengen, bei denen Substrathemmung eintritt, sind ja ganz beträchtlich, wenn man sich vergegenwärtigt, daß der Großteil des Gangliosids an die Membranen gebunden wird. Im oben erwähnten Fall beträgt sie 40 nmol, sonst in der Regel 10 bis 20 nmol je Ansatz, d.h. zwischen 20 und 70 µg Gangliosid G_{D1a} kommen auf 100 µg mikrosomales Protein, nochmal etwa die gleiche Menge mikrosomales Lipid und gegebenenfalls 200 µg Triton X-100. Damit macht das Gangliosid 10 bis 20 % (w/w) der Lipidbestandteile des Ansatzes aus (das Detergens gegebenenfalls mitgerechnet), und es wäre nicht verwunderlich, wenn es bei so hohen Konzentrationen in der Membran Cluster bilden würde (vgl. Einleitung), wozu Sphingolipide aufgrund ihrer freien Hydroxylgruppe am Ceramidrest sowieso neigen (178, Ü 16). Möglicherweise binden diese Cluster an die Sialidase, ohne daß sie als Substrate dienen können (kompetitive Hemmung). Gatt und Bartfai (64) konnten für ein System Monomer/Mizelle rechnerisch eine Substrathemmung simulieren; ersetzt man dabei die kritische Mizellkonzentration durch eine "kritische Clusterbildungskonzentration", so lassen sich diese Überlegungen ohne weiteres auf das System Monomer/Cluster übertragen.

Die Annahme einer kompetitiven Hemmung durch die Cluster erscheint jedoch gar nicht notwendig. Man hat festgestellt, daß innerhalb von Lipidclustern im Gelzustand die laterale Diffusion etwa zwei Größenordnungen langsamer

abläuft als in einer fluiden Membrumgebung (38, 289, 234, 54). Schon nach kurzer Sialidaseeinwirkung könnten daher alle Moleküle am Rand des Clusters zu Gangliosid G_{MI} umgesetzt sein, das wegen der geringeren gegenseitigen Ladungsabstoßung den Cluster sogar noch weiter stabilisiert. Das Gangliosid G_{Dla} im Clusterinneren kann nicht nach außen gelangen, steht damit nicht als Substrat zur Verfügung, und die enzymatische Reaktion kommt zum Erliegen. Vielleicht bildet die Sialidase sogar selbst Kristallisationskeime für solche Cluster, da sie aufgrund ihres isoelektrischen Punkts von pH 6 (Abschnitt 2.5.3.) beim Inkubations-pH positiv geladen ist und mit den negativ geladenen Gangliosidmolekülen in Wechselwirkung tritt. Sie würde dann von Substrat im Gelzustand regelrecht eingeschlossen, ohne es wegen des fehlenden Substanzaustausches umsetzen zu können.

All diese Überlegungen sind zwar recht spekulativ, doch können sie vielleicht Anregung zu weiteren Experimenten geben, die die offenen Fragen einer Klärung näher bringen.

5. Zusammenfassung und Diskussion

Die membrangebundene Sialidase des Säugerhirns ist in vielerlei Hinsicht ein sehr interessantes Enzym. Zum ersten findet man es besonders reichlich im Gehirn, zusammen mit seinen natürlichen Substraten, den Oligosialogangliosiden. Beide sind spezifische Bestandteile neuronaler, insbesondere synaptischer Plasmamembranen, und so wird ihnen eine wichtige, wenn auch bislang noch ungeklärte Rolle bei der Funktion des Zentralnervensystems zugeschrieben (vgl. Einleitung). Die Ganglioside, vor allem die mehrfach sialylierten, besitzen eine hohe Affinität zu Ca^{2+} (10, 147), einem wichtigen Glied in der Kette der komplizierten Vorgänge, die mit der synaptischen Reizübertragung verknüpft sind. So wurde nicht nur mehrfach vorgeschlagen, daß die Ganglioside an der synaptischen Transmission beteiligt sind (z.B. 146, 251, Ü 194), sondern auch, daß gerade die Sialidase der synaptischen Membranen durch Abspaltung von NeuAc-Resten einen wichtigen Beitrag dazu leistet (218, 199).

Zum zweiten stellt die plasmamembrangebundene Sialidase die einzige Form dieses Enzyms dar, die bisher mit Sicherheit in Kalbs- und auch in Menschenhirn nachgewiesen worden ist, und so kommt ihr im Stoffwechsel der im Hirn reichlich vorhandenen Ganglioside eine Schlüsselrolle zu (vgl. Einleitung). Genetisch bedingte Defekte anderer Sialidaseformen aus anderen Geweben sind mehrfach gefunden worden (z.B. Ü 35), verbunden mit schweren klinischen Manifestationen, bisher aber noch kein Defekt des membrangebundenen Hirnenzyms. Möglicherweise ist dieses Enzym für den Gangliosidstoffwechsel und die Funktion des Nervensystems so unabdingbar notwendig, daß seine Dysfunktion bereits den Fetus zum Absterben bringt und damit einer Beobachtung entgeht.

Zum dritten schließlich ~~lenkt~~ die Sialidase in enzymkinetischer Hinsicht die Aufmerksamkeit auf sich, da sie als membrangebundenes Enzym auf ebenfalls membrangebundene Ganglioside einwirkt. Über die Kinetik solcher enzymatisch katalysierten Reaktionen in zweidimensionalen Membransystemen ist bisher noch recht wenig bekannt, obwohl sehr viele für das Leben äußerst wichtige Vorgänge gerade an und in Membranen ablaufen. Erinnert sei hier nur an die Photosynthese und an die mitochondriale Atmungskette, an Signalübertragungen ganz allgemein (Reizleitung, Hormon/Rezeptor-Wechselwirkungen, Zell-Zell-Kontakt), an lateralen und transversalen Transport und an den Stoffwechsel der die Membran aufbauenden Lipide und Proteine. Mit ein wichtiger Grund für die Lokalisation so vieler Vorgänge in Membranen dürfte in der größeren Effizienz diffusionskontrollierter Reaktionen beim Übergang vom drei- zum zweidimensionalen Reaktionsraum liegen (73).

Auf diesem Hintergrund erschien es sinnvoll, anhand der membrangebundenen Sialidase, die seit einiger Zeit in unserem Arbeitskreis untersucht wird, Studien zum Ablauf und zur Kinetik von Enzym-Substrat-Wechselwirkungen in Membranen durchzuführen. Dabei kam sehr zustatten, daß die Sialidase auch wasserlösliche Verbindungen, wie Sialyllactose und das synthetische 4-MU-NeuAc, als Substrate akzeptiert und damit einen direkten Vergleich zwischen der Reaktionskinetik im zweidimensionalen und im dreidimensionalen Raum zuläßt.

5.1. Charakterisierung der membrangebundenen Sialidase

Als Enzymquelle fanden mikrosomale Membranen aus Kalbshirn Verwendung, da synaptische Membranen weder vom Sialidasegehalt noch von den Leitenzymdaten her irgendwelche Vorteile boten, ihre Darstellung aber wesentlich mehr Schritte erfordert und daher die Enzympräparation potentiell mehr schädigt (Abschnitt 2.1.1.). In tiefgefrorenem Zustand war die Sialidase der mikrosomalen Membranen über Monate und selbst Jahre stabil. Durch den Vorgang des Einfrierens wurde ihre Aktivität insbesondere gegenüber dem lipophilen Substrat Gangliosid G_{D1a} sogar noch erhöht (s. Abschnitt 2.2.1.). In nicht eingefrorenem Zustand konnten die mikrosomalen Membranen im Präparationspuffer (pH 7.2, geringe Ionenstärke) auf Eis einige Wochen ohne größere Aktivitätsverluste gelagert werden, bei 4 bis 8° C noch einige Tage und bei 37° C nur mehr einige Stunden (s. Abschnitt 2.2.2.). Bei 50° C betrug die Halbwertszeit der Inaktivierung 40 bis 45 min, und nach 30 min bei 57° C konnte keinerlei Aktivität mehr gefunden werden.

Beim pH-Wert des optimalen Substratumsatzes von pH 3.6 verlor die membrangebundene Sialidase dagegen schon bei der normalerweise eingehaltenen Inkubationstemperatur von 37° C innerhalb von ein- bis zwei Stunden merklich an Aktivität, bei einer physiologischen Ionenstärke von 150 mM sogar innerhalb einer halben Stunde (s. Abschnitt 2.2.3.). Maximale Stabilität wurde bei schwach saurem pH-Wert (5 bis 6) beobachtet, wo selbst unter 150 mM Ionenstärke nach einem Tag bei 37° C noch keine Verluste festzustellen waren.

Höhere Salzkonzentrationen ($NaCl$, $CaCl_2$) im Testansatz inhibierten die Sialidase zunehmend, bis bei 0.5 M $NaCl$ bzw. 0.15 M $CaCl_2$ der Substratumsatz völlig zum Erliegen kam (s. Abschnitt 2.4.3.). Diese Hemmung erwies sich als weitgehend irreversibel (s. Abschnitt 4.2.) und dürfte in Übereinstim-

mung mit den eben genannten Untersuchungen zur Stabilität der Sialidase - zumindest zum größten Teil - auf eine Inaktivierung des Enzyms zurückgehen, eventuell infolge einer Denaturierung (vgl. auch Abschnitt 4.1.). Ca^{2+} wich von dieser allgemeinen Tendenz insofern etwas ab, als es bereits bei Konzentrationen unter 5 mM spezifisch den Gangliosidumsatz um ca. 30 % zu hemmen vermochte. Möglicherweise spiegelt sich darin das vielfach beschriebene, besondere Komplexationsvermögen von Gangliosiden für Ca^{2+} wider (vgl. Einleitung, sowie 136). Die verschiedenen Pufferanionen Acetat, Formiat und Glykolat (jeweils 0.1 M) zeigten demgegenüber keinen signifikanten Einfluß auf die Gangliosidspaltung (s. Abschnitt 2.4.2.).

Gegenüber proteolytischem Angriff erwies sich die membrangebundene Sialidase als recht stabil. Selbst gleiche Gewichtsteile an Trypsin bzw. Chymotrypsin, bezogen auf mikrosomales Protein, konnten die Sialidase innerhalb einer Stunde bei 37° C und pH 7.2 nur mäßig inaktivieren (s. Abschnitt 2.2.4.).

Durch die beiden nichtionischen Detergentien n-Octyl- β -D-glucopyranosid und Triton X-100 wurde die Sialidaseaktivität unterschiedlich schnell zerstört. In Gegenwart von 150 mM Octylglucosid (kritische Mizellkonzentration = 25 mM) betrug die Halbwertszeit der Inaktivierung bei 37° C und pH 7.2 gut eine Stunde, in Gegenwart von 1 % bzw. 16 mM Triton X-100 (kritische Mizellkonzentration = 0.3 mM) mindestens 10 Stunden (s. Abschnitt 2.2.5.).

Das pH-Optimum der Sialidaseaktivität gegenüber dem lipophilen Substrat Gangliosid G_{D1a} wurde zu etwa pH 3.6 bestimmt. Für die wasserlöslichen Substrate 4-MU-NeuAc und Sialyllactit war es geringfügig ins Alkalische, auf etwa pH 3.9, verschoben (s. Abschnitt 2.4.1.). Eine genauere Untersuchung über einen größeren pH-Bereich ergab, daß die Sialidase zwischen pH 5 und 7 noch eine beträchtliche Restaktivität von - je nach Substrat - 20 bis 40 % des Maximalwerts aufwies. Ein ähnlicher Befund ist bisher nur für eine plasmamembrangebundene Sialidase aus Rattenleber bekannt geworden (277), und dabei auch nur für Gangliosid als Substrat, nicht aber für Sialyllactose. Die pH-Grenzen der membrangebundenen Sialidaseaktivität aus Kalbshirn fallen damit exakt mit den pH-Grenzen ihrer Stabilität zusammen (vgl. z.B. Abb. 9 c in Abschnitt 2.2.3. mit Abb. 20 in Abschnitt 2.4.1.). Neben einer Verschiebung des pH-Optimums durch unterschiedliche Ionenstärken im Inkubationsansatz (vgl. 205, Ü 35) könnte darin ein weiterer Grund zu finden sein, warum die in der Literatur berichteten Optima so sehr voneinander abweichen (vgl. Einleitung): Je nach Vorbehandlung der Sialidase-

präparation und den Inkubationsbedingungen (Inkubationszeit, Ionenstärke, Zusätze, etc.) verändert insbesondere die saure Flanke der Stabilitätskurve ihre Lage und damit auch das Optimum. So dürfte die durch die Zusätze Lachgas und n-Hexanol verursachte Verschiebung des pH-Optimums für den Umsatz von Sialyllactit ins Alkalische (Abb. 18 in Abschnitt 2.4.1.) auf die destabilisierende Wirkung dieser Substanzen auf die Sialidase zurückzuführen sein.

Alle bisher beschriebenen Resultate zur Charakterisierung der verwendeten Sialidasepräparation wurden mit zugesetzten lipophilen (Gangliosid G_{D1a}) oder wasserlöslichen (4-MU-NeuAc, Sialyllactit) Substraten erhalten, in den allermeisten Fällen in direktem Vergleich miteinander. Abgesehen von kleineren quantitativen Abweichungen waren die Resultate unabhängig vom gewählten Substrat und stimmten in den wenigen Fällen, für die vergleichbare Daten zur Verfügung standen, gut mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen überein (s. Kapitel 2. unter den jeweiligen Abschnitten). Dieser Gleichklang der Aussagen mit hydrophilem und lipophilem Sialidase-substrat stützt die Annahme, daß die mikrosomalen Membranen tatsächlich nur eine einzige Form der Sialidase enthalten, die beide Substrattypen spaltet, und nicht mehrere Sialidasen unterschiedlicher Substratspezifität, wie dies für Leber postuliert wurde (157, Ü 35). In Übereinstimmung mit dieser Interpretation konkurrierten die beiden Substrate Gangliosid G_{D1a} und 4-MU-NeuAc eindeutig miteinander, wenn sie gleichzeitig der membrangebundenen Sialidase angeboten wurden. Im Widerspruch dazu fielen jedoch bei allen Mischungsverhältnissen die Umsatzraten für Gangliosid G_{D1a} stets höher und für 4-MU-NeuAc stets niedriger aus, als von der enzymkinetischen Theorie für den Abbau zweier Substrate durch ein aktives Zentrum her zu fordern wäre (s. Abschnitt 2.5.2.). Auch der potente Sialidaseinhibitor NeuAc-2-en (vgl. 270) hemmte den Umsatz beider Substrate in sehr unterschiedlichem Ausmaß: Im Fall von 4-MU-NeuAc betrug die Hemmkonstante K_I etwa 0.004 mM, im Fall von Gangliosid G_{D1a} dagegen etwa 0.13 mM (s. Abschnitt 2.5.1.). Damit war trotz der zuvor erwähnten Ergebnisse nicht auszuschließen, daß die beiden Substrate nicht um eine gemeinsame Sialidase konkurrierten, sondern lediglich gegenseitig den durch zwei verschiedene Sialidasen erfolgenden Abbau kompetitiv inhibierten. Eine zur Klärung dieser Frage unternommene partielle Reinigung der im nativen Zustand fest membrangebundenen Sialidase

(s. Abschnitt 2.2.4. und 2.5.3.) durch Auflösen des Membranverbands in einem Überschuß des Detergens Triton X-100, differentielle Zentrifugation des dispergierten Materials in einem Saccharosegradienten und anschließende isoelektrische Fokussierung (der isoelektrische Punkt der Sialidase wurde dabei zu pH 6.0 bestimmt) konnte jedoch die Sialidaseaktivitäten gegenüber den beiden Substraten auch nicht andeutungsweise voneinander trennen (s. Abschnitt 2.5.3.). Daher wird weiterhin davon ausgegangen, daß die mikrosomalen Membranen aus Kalbshirn nur eine einzige Sialidase enthalten, die sowohl lipophile Gangliosidsubstrate als auch die hydrophilen Substrate Sialyllactit und 4-MU-NeuAc spaltet. Vielleicht vermögen die bereits angesprochenen Besonderheiten der Enzym-Substrat-Wechselwirkung an und in Membranen einen Schlüssel zum Verständnis der aufgetretenen Diskrepanzen zu liefern.

5.2. Modellvorstellungen zum Abbau hydrophiler und amphiphiler Substrate durch die membrangebundene Sialidase

Wasserlösliche Substrate gelangen über die wässrige Phase zur membranständigen Sialidase, und die Kinetik ihres Umsatzes sollte sich im Prinzip nicht von der üblichen Enzymkinetik in wässrigen Lösungen unterscheiden. Wie aber treten membrangebundene Sialidase und in mizellarer Form zugesetztes Gangliosid miteinander in Kontakt ?

Zentrifugationsstudien (s. Abschnitt 2.3.5.1.) ergaben, daß sich mizellares [^3H]-Gangliosid G_{D1a} sehr schnell mit den mikrosomalen Membranen verband, wobei - ähnlich wie bei Einbaustudien an Zellkulturen (21, 191, 227) - zwei Stufen der Assoziation beobachtet wurden: Ein Teil des gebundenen Gangliosids ließ sich durch Behandeln der Membranen mit Trypsin wieder ablösen, der andere nicht. Der letztgenannte, trypsininstabile Anteil nahm mit der Inkubationszeit kontinuierlich zu, und selbst bei $0.1 \mu\text{mol}$ Gangliosid je mg mikrosomalem Protein waren keine Anzeichen einer Sättigung der Membranen zu erkennen (s. Abschnitt 4.1.). Des weiteren nahm dieser Anteil bei konstanter Inkubationszeit mit fallendem pH-Wert des Ansatzes zu (Maximalwert etwa bei pH 3) und mit steigender Ionenstärke ab (s. Abschnitt 2.4.1. und 2.4.3.).

Um Hinweise auf den Aggregationszustand des fest gebundenen Gangliosidanteils zu erhalten, wurde in Zusammenarbeit mit G. Schwarzmann erstmals ein im hydrophoben Molekülteil spinmarkiertes Analogon des Gangliosids G_{D1a}

synthetisiert, dessen Zuckeranteil außerdem noch ^3H enthielt (= ^3H -Doxyl- $^3\text{G}_{\text{D1a}}$ "), zur Struktur s. Abb. 14 in Abschnitt 2.3.5.2.). Mit Hilfe der ESR-Technik ließ sich zeigen, daß sich diese Verbindung unter Auflösung der mizellaren Struktur in mikrosomale Membranen inseriert und dabei mit den Membranlipiden verdünnt wird, sich also mit diesen in der gleichen Lipiddoppelschicht aufhält. Leider wurde das ^3H -Doxyl- $^3\text{G}_{\text{D1a}}$ wesentlich schneller von den Membranen aufgenommen als ^3H -Gangliosid G_{D1a} (vermutlich wegen der sperrigen und auch leicht hydrophilen Doxyl-Gruppierung, die die Mizellstruktur labilisieren dürfte), so daß die Zentrifugations- und die ESR-Studien nur halbquantitativ miteinander vergleichbar sind. Die nach beiden Methoden übereinstimmenden Resultate für den Einbau von ^3H -Doxyl- $^3\text{G}_{\text{D1a}}$ lassen jedoch annehmen, daß auch das nach Trypsinbehandlung mit den mikrosomalen Membranen assoziierte ^3H -Gangliosid G_{D1a} in die Membranen inseriert ist, zumindest zum größten Teil (s. Abschnitt 2.3.5.2.). Zu ganz ähnlichen Schlüssen kamen Schwarzmann et. al. (227) in nachfolgenden, systematischen Untersuchungen zum Einbau verschiedener ^3H - und spinmarkierter Ganglioside bzw. Gangliosid-Analoga in die Plasmamembranen lebender Zellen. Sie konnten zeigen, daß das nach Trypsinbehandlung auf den Zellen verbleibende Gangliosidanaloga zu mindestens 70 % in die Lipidmembran inseriert war.

Die Gültigkeit einer solchen Interpretation auch für die in der vorliegenden Arbeit verwendeten mikrosomalen Membranen wird zusätzlich durch die Beobachtung gestützt, daß das Reaktionsprodukt der sialidasekatalysierten Gangliosidspaltung, das Gangliosid G_{M1} , nach Zentrifugation immer nur im mikrosomalen Pellet, nie aber in den freien oder mit Trypsin freisetzbaren Gangliosidmizellen nachzuweisen war (s. Abschnitt 2.3.5.1.). Weitere Hinweise darauf, daß die membrangebundene Sialidase nur Gangliosid G_{D1a} spalten kann, das in die gleiche Membran eingebaut ist, nicht jedoch Gangliosid freier oder an die Membran bloß adsorbierter Gangliosidaggregate, kamen von Versuchen zum Abbau vesikulär gebundenen Gangliosids. Bot man der Sialidase künstliche, einschalige Lipidvesikel aus Eilecithin, Cholesterin, und 10 mol-% Gangliosid G_{D1a} als Substrat an, so wurde das enthaltene Gangliosid deutlich langsamer umgesetzt als mizellares. Eine Erniedrigung der Membranviskosität durch Inkubation in Gegenwart von 30 atm Lachgas (N_2O) oder ein Zusatz von 5 Einheiten des Aktivatorproteins für den lysosomalen Abbau des Gangliosids G_{M2} durch die lysosomale Hexosaminidase (34) führte zu einer starken Stimulierung insbesondere des Abbaus vesikulären Gangliosids

(Abschnitt 2.3.4.). Das Aktivatorprotein kann den Gangliosidtransfer (34) zwischen den vesikulären und den mikrosomalen Membranen katalysieren, während die geringere Membranviskosität Fusionen beider Membranen erleichtern dürfte. Über beide Mechanismen würde die Menge des in die sialidasehaltigen Membranen eingebauten Gangliosids G_{D1a} steigen und so die erhöhte Geschwindigkeit seines Umsatzes erklären.

Aufbauend auf den Überlegungen von Sandhoff und Mitarbeitern (208, 175, 214, 210) läßt sich daher folgendes Modell für die Wechselwirkung der membrangebundenen Sialidase mit ihren Substraten entwerfen (Abb. 44): Wasserlösliche Substrate (z.B. 4-MU-NeuAc) diffundieren über die wässrige Phase zum aktiven Zentrum und werden nach der klassischen Theorie zur Enzymkinetik von Michaelis und Menten (155, 18) umgesetzt. Den mikrosomalen Membranen zugesetzte lipophile Substrate in mizellarer Form (z.B. Gangliosid G_{D1a}) müssen sich erst in die Membranen einbauen und gelangen dann durch laterale Diffusion in der - verglichen mit Wasser - hochviskosen Membran zum aktiven Zentrum der Sialidase.

Dieses auf den ersten Blick recht einfache Modell hat nun eine ganze Reihe von Konsequenzen:

1. Es bietet eine Erklärung für die beschriebene unterschiedliche Hemmung des Abbaus beider Substrattypen durch den Inhibitor NeuAc-2-en und für das von der "Ein-Enzym-Theorie" abweichende Konkurrenzverhalten beider Substrate um das aktive Zentrum. Alle Sialidasesubstrate tragen wegen der enthaltenen Neuraminsäure(n) ($pK_s = 2.7$, vgl. Einleitung) beim Inkubations-pH negative Ladung(en), auch der Inhibitor NeuAc-2-en. Konkurriert nun der Inhibitor mit 4-MU-NeuAc, so spielt dies keine besondere Rolle, im Fall von Gangliosid G_{D1a} jedoch wird die sialidasehaltige Membran durch dessen Insertion negativ aufgeladen und es baut sich ein Oberflächenpotential auf (vgl. Abschnitt 2.5.2.). NeuAc-2-en wird dadurch abgestoßen, seine effektive Konzentration an der Membranoberfläche sinkt und die Inhibitionskonstante K_I nimmt zu.

Ganz entsprechend verhält es sich mit der Konkurrenz zwischen wasserlöslichem und lipophilem Substrat. Die negative Membranladung erniedrigt die Konzentration des wasserlöslichen Substrats in der Umgebung der Sialidase, was sich kinetisch gesehen wie eine Verringerung der scheinbaren Affinität der Sialidase zu 4-MU-NeuAc (größere scheinbare Michaelis-Konstante K_M)

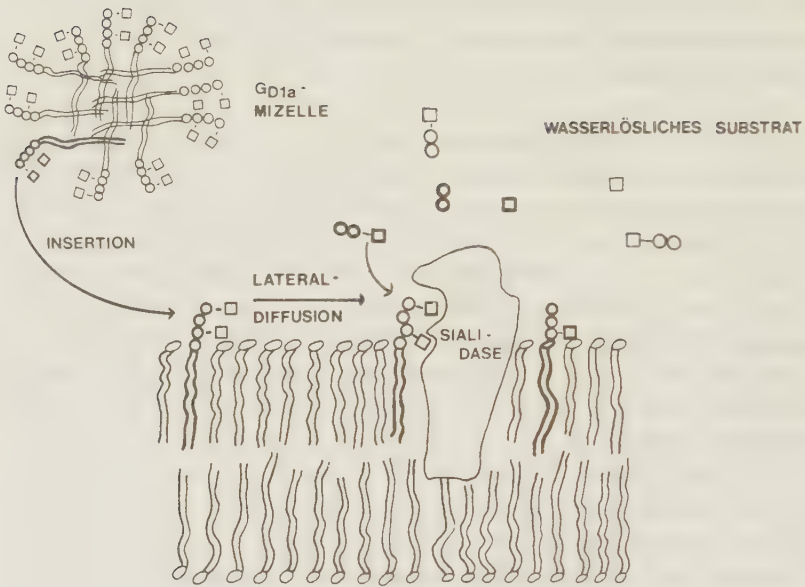


Abb. 44

Modell zur Wechselwirkung der membrangebundenen Sialidase mit ihren Substraten

auswirkt, so daß sein Umsatz stärker gehemmt wird als von dem in Abwesenheit von Gangliosid gemessenen Wert für K_M her zu erwarten wäre. Für den Umsatz von Gangliosid gilt entsprechend genau das Umgekehrte. Sehr ähnliche Einflüsse einer Membranladung auf Michaelis-Konstanten wurden auch in anderen Arbeitsgruppen beobachtet, wenn auch, soweit bekannt, nicht in dem Ausmaß (s. Abschnitt 2.5.2.). Ob solche Ladungseffekte in vollem Umfang und in allen Einzelheiten die Unterschiede in den Hemmdaten befriedigend zu erklären vermögen, läßt sich nur schwer beurteilen, da sie auf unbekannte Weise von vielen unwägbaren Faktoren wie Ionenstärke, pH-Wert, Membranzusammensetzung und -struktur, etc. abhängen (vgl. z.B. Ü 76). Zusätzlich unterstützt werden

könnte die Bevorzugung von Gangliosid G_{D1a} durch eine von Sandhoff und Pallmann (208) postulierte, zweite hydrophobe Bindungsstelle an der Sialidase, deren Besetzung durch ein Gangliosidmolekül die Konformation der Sialidase derart ändert, daß das aktive Zentrum für wasserlösliche Verbindungen schwerer zugänglich wird.

2) Für das Gangliosidsubstrat ist nicht - wie für das wasserlösliche Substrat - das Ansatzvolumen, sondern die Membranoberfläche der eigentliche Reaktionsraum. Übereinstimmend damit nahm - anders als im Fall von 4-MU-NeuAc als Substrat - nach erfolgtem Gangliosideinbau in die mikrosomalen Membranen die Umsatzgeschwindigkeit für das Gangliosid nicht ab, wenn der Testansatz mit substratfreiem Inkubationspuffer bis auf das achtfache Volumen verdünnt wurde, sondern blieb unverändert (s. Abschnitt 4.2.). Wurde der gleiche Versuch in Gegenwart von 0.1 % (w/v) Triton X-100 im Ansatz durchgeführt, so ergab sich das gleiche Resultat, wenn der zum Verdünnen verwendete Puffer detergensenfrei war. Enthielt er aber auch 0.1 % Triton, so sank die Umsatzrate für Gangliosid G_{D1a} stark ab. Im detergensenhaltigen System tragen offensichtlich nicht allein die Membranen zum ausschlaggebenden Raum für die Reaktion bei, sondern auch das Detergens, das sich mit den Membranen zu Detergens/Lipid/Protein-Mischaggregaten verbindet. Wird ohne weitere Detergensenzugabe verdünnt, bleibt der Reaktionsraum gleich und demzufolge auch die Umsatzgeschwindigkeit. Setzt man aber mit dem Verdünnungspuffer weiteres Detergens zu, so nimmt das Volumen der Mischaggregate zu und das enthaltene Gangliosid wird nun wirklich verdünnt, mit der Konsequenz einer sinkenden Abbaurate.

3) Eingesetzte Enzymmenge und effektives Reaktionsvolumen sind untrennbar miteinander verknüpft. Daraus läßt sich bei konstanter Gangliosidkonzentration im Ansatz eine hyperbole Abhängigkeit der Umsatzrate von der eingesetzten Menge an membrangebundener Sialidase ableiten (s. Abschnitt 3.3.). In der Tat stieg im Experiment der Gangliosidumsatz nicht linear mit der Enzymmenge an, wie im Fall des wasserlöslichen Substrats 4-MU-NeuAc, sondern ging gegen einen Grenzwert (s. Abschnitt 4.3.). Ausgedrückt im Formalismus der Enzymkinetik beruht dieser nicht lineare Verlauf der Proteinabhängigkeit auf einer Proportionalität zwischen der eingesetzten Menge an mikrosomalen Membranen und der scheinbaren Michaelis-Konstante für den Gangliosidabbau (s. Abschnitt 3.3.). Die in Gegenwart verschiedener Mengen an membrangebundener Sialidase ermittelten Werte für K_M bestätigten diese Theorie, während

die für den Abbau von 4-MU-NeuAc bestimmten Michaelis-Konstanten von der eingesetzten Menge an mikrosomalen Membranen unabhängig waren (s. Abschnitt 4.3.).

Schätzt man das Volumen des für den Gangliosidumsatz maßgebenden Reaktionsraums "Membran" unter den gewählten Inkubationsbedingungen ab, so ergibt sich, daß es um den Faktor Hundert bis Tausend kleiner ist als das wässrige Gesamtvolumen der Testansätze (s. Abschnitt 3.2.). Das beinhaltet eine enorme Konzentrierung des Gangliosidsubstrats im Vergleich zum wasserlöslichen 4-MU-NeuAc, die sich auch in den Michaelis-Konstanten niederschlagen sollte. Die tatsächlich mit beiden Substraten gemessenen Werte für K_M sind jedoch von ähnlicher Größenordnung oder unterscheiden sich um nicht mehr als den Faktor 10 in Gegenwart von 0.2 % Triton X-100 (s. Tab. 7 in Abschnitt 2.5.1.). Nach dem Modell liegt der Grund dafür in der lateralen Diffusion, die dem Abbau des Gangliosids vorausgeht. Die Viskosität von Lipidmembranen ist um etwa zwei Zehnerpotenzen größer als die von Wasser und dementsprechend die laterale Diffusionsgeschwindigkeit um zwei Größenordnungen kleiner als die Geschwindigkeit für die Diffusion in wässrigen Lösungen (s. Abschnitt 3.4.). Diese verglichen mit 4-MU-NeuAc wesentlich langsamere Diffusionsgeschwindigkeit, mit der das Gangliosid zur Sialidase gelangt, gleicht den Vorteil aufgrund der höheren effektiven Konzentration in der Membran größenordnungsmäßig wieder aus. Nun läßt sich aber die Membranviskosität durch lipidlösliche Substanzen, die sich in Membranphasen einlagern und die Packung der Lipidketten stören, absenken. Dies führt zu weiteren, dem Experiment zugänglichen Konsequenzen aus dem vorgeschlagenen Modell.

4) Membranfluidisierende Substanzen sollten die Geschwindigkeit der lateralen Diffusion erhöhen, damit auch das effektive Substratangebot für die membrangebundene Sialidase und so schließlich die Abbaurrate für Gangliosid G_{D1a} (s. Abschnitt 3.4.). Tatsächlich konnte anhand der homologen Reihe der primären Alkohole Methanol bis n-Octanol gezeigt werden, daß insbesondere die längerkettigen Vertreter die Umsatzrate für Gangliosid G_{D1a} bis auf den dreifachen Wert zu steigern vermochten (s. Abschnitt 4.4.2.). Bei gleicher Konzentration in den mikrosomalen Membranen erwiesen sich die Alkohole n-Pentanol bis n-Octanol als nahezu gleich wirksam. Im Fall der kurzkettigen Vertreter Methanol bis n-Butanol war der Stimulierung eine besonders bei hohen Konzentrationen sehr ausgeprägte Inhibierung der Sialidase über-

lagert, sehr wahrscheinlich aufgrund einer Enzymdenaturierung. Diese Inaktivierung ließ sich sehr gut am Umsatz des wasserlöslichen Substrats 4-MU-NeuAc verfolgen, der ja nach den Modellvorstellungen von einer erniedrigten Membranviskosität nicht profitiert. Mit der Kettenlänge des Alkohols nahm die inaktivierende Wirkung deutlich ab, selbst mit Bezug auf die Membrankonzentration.

Parallel zur Sialidaseaktivität wurde die Viskosität, bzw. ihr Kehrwert, die Fluidität, der mikrosomalen Membranen anhand der Fluoreszenzdepolarisation des in die Membranen eingebauten Fluoreszenzfarbstoffs DPH gemessen (s. Abschnitt 4.4.1.). Der Gangliosidumsatz korrelierte ausgezeichnet mit der so bestimmten Membranfluidität, gleichgültig, welcher der Alkohole n-Pentanol bis n-Octanol die Fluidisierung bewirkte (s. Abschnitt 4.4.3.). Damit bestätigte sich, daß die Stimulierung des Gangliosidumsatzes nicht auf einem spezifischen Effekt eines Alkohols, sondern offenbar auf der durch ihn gesteigerten Membranfluidität beruht.

5) Aus dem Zusammenhang zwischen Membranfluidität und lateraler Diffusionsgeschwindigkeit läßt sich ableiten, daß die Umsatzsteigerung enzymkinetisch auf eine Erniedrigung der scheinbaren Michaelis-Konstante zurückgehen sollte (s. Abschnitt 3.4.). Am Beispiel von n-Hexanol konnte gezeigt werden, daß - wie von der Theorie gefordert - der Kehrwert der in Gegenwart verschiedener Hexanolkonzentrationen bestimmten Michaelis-Konstante linear mit der bei gleichen Alkoholkonzentrationen gemessenen Membranfluidität anstieg (s. Abschnitt 4.4.4.).

In all den genannten Punkten stimmt also das entworfene Modell zur Wechselwirkung der membrangebundenen Sialidase mit ihren lipophilen und hydrophilen Substraten hervorragend mit dem Experiment überein, doch darf dies nicht über die trotz allem vorhandenen "Schwachstellen" der vorgestellten Versuchsergebnisse hinwegtäuschen.

5.3. Einige kritische Bemerkungen zu den Versuchsbedingungen und weitere Kontrollversuche

Der enzymatische Test der membrangebundenen Sialidase ist mit manchen Schwierigkeiten behaftet, die eine Messung einwandfreier Anfangsgeschwindigkeiten im Sinne der Enzymkinetik nicht zulassen:

1) Die Enzympräparation enthält endogene Substrate, die mit den zugesetzten Substraten konkurrieren. Diese endogenen Substrate wirken für den beobachteten Substratumsatz wie kompetitive Inhibitoren und verfälschen die ermittelten Michaelis-Konstanten in Richtung größerer Werte, unter bestimmten Voraussetzungen um einen additiven Betrag, der ihrer Konzentration entspricht (s. Abschnitt 6.3.6.3.)

2) Die membrangebundene Sialidase wird unter den Inkubationsbedingungen langsam, aber irreversibel inhibiert, insbesondere wenn die Tests in Gegenwart physiologischer Ionenstärke (150 mM) durchgeführt werden. Damit ist im zeitlichen Durchschnitt eine geringere Enzymmenge aktiv, als ursprünglich eingesetzt wurde, und die Maximalgeschwindigkeit $V_{\max}$, in die gemäß $V_{\max} = k_2[E]$ die Konzentration an aktivem Enzym eingeht, nimmt mit der Inkubationszeit ab. Die Aussagen innerhalb einer Versuchsserie mit konstanter Inkubationszeit sollten aber dadurch nicht verfälscht werden.

3) Im Fall des Gangliosidumsatzes treten noch weitere Komplikationen hinzu, die ja zum Teil schon im vorgeschlagenen Modell zum Ausdruck kommen. Die unter formaler Anwendung der Theorie der klassischen Enzymkinetik gewonnene "Konstante" K_M ist nicht wirklich konstant, sondern eine Funktion der eingesetzten Enzymmenge und der Fluidität der enzymhaltigen Membranen. Die eigentlichen Unwägbarkeiten bringt aber der dem enzymatischen Abbau vorausgehende Einbau des Gangliosids in die mikrosomalen Membranen mit sich. Er erfolgt zwar deutlich schneller als der Abbau, doch läßt er keine exakte Festlegung der dem Enzym tatsächlich zur Verfügung stehenden Gangliosidkonzentration zu. Man kann lediglich nach Ende der Inkubation - wie geschildert - mit Trypsin behandeln und nach Zentrifugation das dann eingebaute Gangliosid bestimmen. Für Routinemessungen war diese Methode jedoch zu aufwendig und wurde nur zu Kontrollzwecken eingesetzt. Die für den Routine-test gewählten Inkubationszeiten von 30 oder 60 min sind daher ein Kompromiß, um einerseits zu gewährleisten, daß sich der Großteil des angebotenen Gangliosids während der Inkubation in die mikrosomalen Membranen einbaut, und um sich andererseits nicht allzuweit von Bedingungen der Anfangsgeschwindigkeit zu entfernen. Nicht immer konnte dieser Kompromiß voll zufriedenstellen, da ja die Inkubationszeit wegen der Enzyminaktivierung (s. vorhergehender Punkt) innerhalb einer Versuchsreihe nicht verändert

werden durfte und somit einer veränderten Enzymaktivität - z.B. in Gegenwart steigender Alkoholkonzentrationen - nicht angepaßt werden konnte. Bei der Bestimmung enzymkinetischer Konstanten wurde versucht, dem durch besondere Verfahren der Kurvenanpassung Rechnung zu tragen (s. Abschnitt 6.3.6.)

Besondere Kontrollversuche wurden darüber hinaus zur Abhängigkeit des Gangliosidumsatzes von der Membranfluidität durchgeführt. Nach dem entwickelten Modell verursacht ja nicht nur eine erleichterte Lateraldiffusion eine Erhöhung des effektiven Substratangebots für die membrangebundene Sialidase, sondern auch ein beschleunigter Gangliosideinbau in die mikrosomalen Membranen. Zentrifugationsstudien ergaben, daß bei erhöhter Membranfluidität durch n-Hexanol auch der Gangliosideinbau schneller erfolgt, daß aber auch nach Berücksichtigung dessen ein nicht einbaubedingter Anteil der Umsatzstimulierung übrigbleibt (s. Abschnitt 4.1.). Eine quantitative Trennung beider Effekte ist auf der Grundlage dieser Daten leider nicht möglich, doch dürfte die sehr gute Korrelation zwischen dem Kehrwert der Michaelis-Konstante und der Membranfluidität auch dem Umstand zu verdanken sein, daß proportional mit der Membranfluidität nicht nur die laterale Diffusionsgeschwindigkeit, sondern auch die Einbaurate anstieg.

Wollte man den Einfluß des Gangliosideinbaus auf den Gangliosidumsatz wirklich ausschließen, so gab es nur einen sicheren Weg: Man mußte die Geschwindigkeit des Abbaus der von Natur aus in den mikrosomalen Membranen enthaltenen endogenen Substrate bestimmen. Zu diesem Zweck wurde eine Methode entwickelt, die es gestattet, speziell den Umsatz endogener Gangliosidsubstrate zu messen (s. Abschnitt 2.3.1. und 6.3.5.). Sie ist zwar wesentlich aufwendiger, als der gewöhnliche radiometrische Enzymtest, doch konnten zu einigen wichtigen Fragen exemplarisch Untersuchungen durchgeführt werden.

Der endogene Gangliosidgehalt der verwendeten mikrosomalen Membranen aus Kalbshirn schwankte je nach Präparation um ca. 20 nmol Gangliosid je mg mikrosomalem Protein. 50 bis 60 mol-% davon bestanden aus Gangliosid G_{D1a} , 20 bis 30 mol-% aus Gangliosid G_{M1} und der Rest verteilte sich auf die anderen Spezies der häufigeren Ganglioside (s. Abschnitt 2.3.1.). Bei geringer Salzkonzentration im Ansatz (23 mM Ionenstärke) und pH 3.6 wurden alle Ganglioside mit endständiger NeuAc von der Sialidase innerhalb von zehn

bis zwanzig Stunden vollständig zum Endprodukt Gangliosid G_{M1} abgebaut (s. Abschnitt 2.3.1.). Bei physiologischer Ionenstärke dagegen kam nach wenigen Stunden die Gangliosidspaltung völlig zum Erliegen, in Einklang mit der mehrfach gefolgerten Instabilität der Sialidase bei pH 3.6 und 150 mM Ionenstärke (s. Abschnitt 2.4.3.).

In Gegenwart von 24 mM n-Hexanol wurde die Umsatzrate für endogenes Gangliosid G_{D1a} auf den grob zehnfachen Wert beschleunigt und damit eine einbauunabhängige Stimulierung des Gangliosidabbaus eindeutig nachgewiesen (s. Abschnitt 4.4.2.). Darüber hinaus ließ sich anhand der mit exogenem [3H]-Gangliosid G_{D1a} ermittelten kinetischen Konstanten für die Gangliosidspaltung und anhand der bekannten Konzentration an endogenem Gangliosid quantitativ abschätzen, daß das nach Trypsinbehandlung mit den mikrosomalen Membranen assoziierte exogene Gangliosid von der membrangebundenen Sialidase mit gleicher Affinität und Aktivität umgesetzt wurde wie das endogene. Neben den ESR-Studien mit dem spinmarkierten Gangliosid-Analogon und neben der fest membrangebundenen Natur des enzymatisch freigesetzten Gangliosids G_{M1} sind diese Resultate eine zusätzliche starke Stütze für die Richtigkeit der Schlußfolgerung, daß das nach Trypsinbehandlung an die Membranen gebundene Gangliosid G_{D1a} auf natürliche Weise in diese inseriert ist und von der Sialidase in gleicher Weise wie das endogene Gangliosid als Substrat erkannt wird.

Dementsprechend konnten anhand des Abbaus endogenen Gangliosids zwei weitere der mit exogenem Gangliosid G_{D1a} erhaltenen Resultate bestätigt werden: Zum einen das Ergebnis der Zentrifugationsstudien zur pH-Abhängigkeit des Gangliosidumsatzes, wonach mit Bezug auf die eingebaute Gangliosidmenge die membrangebundene Sialidase bei pH 7 mit etwa 40 % ihrer maximalen Aktivität arbeitet (s. Abschnitt 2.4.1.); zum andern der Befund, daß in Gegenwart physiologischer Ionenstärke und pH 3.6 Gangliosid G_{D1a} von frisch präparierten mikrosomalen Membranen langsamer umgesetzt wird als nach Einfrieren und Wieder-Auftauen der Präparation (s. Abschnitt 4.5.).

Fragt man nun nach einer Erklärung für dieses zuletzt genannte Versuchsergebnis, so scheidet eine erhöhte Membranfluidität dafür aus, da laut Fluoreszenzdepolarisationsmessungen der Einfriervorgang die Fluidität mikrosomaler Membranen ganz im Gegenteil sogar noch leicht absenkt (s. Abschnitt 4.5.). Offensichtlich gelangt hier das vorgeschlagene Modell zur

Wechselwirkung der membrangebundenen Sialidase mit ihren Substraten an seine Grenzen.

5.4. Grenzen des entworfenen Modells und einige darüber hinausgehende Spekulationen

Führt man sich die große Einfachheit des vorgeschlagenen Modells vor Augen, so sollte nicht verwundern, daß es nur einige Teilaspekte der Vorgänge an und in Membranen erfaßt. Es betrachtet die mikrosomalen Membranen als fluide Lipiddoppelschichten, in denen Gangliosid und Sialidase ungehindert via lateraler Diffusion miteinander in Wechselwirkung treten können. In Wirklichkeit sind die Strukturen natürlicher Membranen wesentlich komplexer (Ü 102, 59, Ü 33, 94, Ü 190), obwohl das Wissen darüber heute noch recht lückenhaft ist: Sie bestehen aus einer Vielfalt von Lipiden und Proteinen und es kommt in der Membranebene zu lateralen Phasentrennungen mit äußerst komplizierten Phasengleichgewichten, die von vielen Faktoren wie Lipid- und Proteinzusammensetzung, Temperatur, Ionenmilieu, pH-Wert, membranativen lipidlöslichen Substanzen, etc. beeinflusst werden. Als Folge davon besitzen Membranen eine Art "Gedächtnis", d.h., ihre Eigenschaften hängen von ihrer Vorgeschichte ab (einfachste Form: Hystereseeffekte). Dieser Nahordnung aufgrund der Lipid- und Proteinzusammensetzung steht eine Fernordnung gegenüber, die die Membran räumlich in funktionelle Kompartimente gliedert, in denen Reaktionen effizient und voneinander ungestört ablaufen können.

In der vorliegenden Arbeit wurden keine gezielten Versuche zu den diesbezüglichen Eigenschaften der benutzten mikrosomalen Membranen aus Kalbshirn unternommen, und so können darüber im Grunde nur Spekulationen angestellt werden. Doch wurden am Rande der Arbeit eine Reihe von Beobachtungen, wie z.B. die erwähnten Auswirkungen des Einfriervorgangs auf die Eigenschaften der Sialidase, gemacht, die schlaglichtartig einige mögliche Aspekte einer solchen komplexen Membranstruktur aufzeigen, ohne sie beweisen zu wollen. Diese Beobachtungen sind in Abschnitt 4.5. gesammelt und sollen hier nur auszugsweise wiederholt werden.

Eine Auswertung der kinetischen Daten ergab, daß das Einfrieren mikrosomaler Membranen in erster Linie die Maximalgeschwindigkeit $V_{\max}$ des Gangliosidumsatzes steigert. Die membrangebundene Sialidase zeigt gegenüber Gangliosid G_{D1a} also eine Art einfrierlabile "Latenz", die mit dem wasser-

löslichen Substrat 4-MU-NeuAc nicht zu beobachten war. Neben dem Einfriervorgang hoben auch eine niedrige Ionenstärke im Ansatz und eine durch n-Hexanol erhöhte Membranfluidität diese Latenz auf. Dementsprechend dürfte die alkoholinduzierte Steigerung des Gangliosidumsatzes nicht nur auf sinkende K_M -Werte, sondern zum Teil auch auf eine Aufhebung der Latenz der Sialidase zurückgehen, was den beobachteten, irreversiblen Anteil der Stimulierung erklären könnte.

Eine Lagerung mikrosomaler Membranen über Tage und Wochen führte zu einer Verringerung ihrer Fluidität (gemessen anhand der Fluoreszenzdepolarisation von DPH), die in scheinbar offenem Widerspruch zum vorgeschlagenen Modell mit einer starken Abnahme der Michaelis-Konstante für den Gangliosidumsatz - nicht aber derjenigen für den 4-MU-NeuAc-Umsatz - verbunden war. Eine Vorinkubation mikrosomaler Membranen in Abwesenheit von Substrat bei 37° C, neutralem pH-Wert und niedriger Ionenstärke stimulierte im anschließenden enzymatischen Test den Gangliosidabbau z.T. erheblich, die 4-MU-NeuAc-Spaltung dagegen nicht oder nur geringfügig.

Alle diese Beobachtungen lassen sich plausibel erklären (s. Abschnitt 4.5.), wenn man annimmt, daß die mikrosomalen Membranen im nativen Zustand sowohl in Form einer Kompartimentierung (Fernordnung) als auch in Form einer lateralen Phasentrennung (Clusterbildung, Nahordnung) strukturiert sind. Während des Einfriervorganges zerreißen die Membranen infolge der Kristallisation des Wassers und die Fernordnung bricht zusammen. Niedrige Ionenstärke und hohe Membranfluidität bewirken das gleiche, indem sie in die großenteils unbekannten Mechanismen eingreifen, die die Kompartimentierung aufrechterhalten. Lagerung bei niedrigen Temperaturen hingegen verändert die Nahordnung, indem es die Ausbildung von Lipidclustern im Gelzustand fördert und die Sialidase zusammen mit anderen Proteinen und Lipiden in fluiden Membranbereichen konzentriert, die dann zum eigentlichen Reaktionsraum für die Gangliosidspaltung werden. Die aus der Literatur und eigenen Versuchen bekannte Hemmung des Gangliosidabbaus bei hohen Gangliosidkonzentrationen (Substrathemmung) ließe sich im Rahmen dieser Vorstellungen als eine Ausbildung von Gangliosidaggregaten innerhalb der Membran deuten, die das Substrat der enzymatischen Reaktion entziehen oder die Sialidase kompetitiv hemmen (s. Abschnitt 2.3.3. und 4.5.).

Auf diesem Hintergrund muß das zur Überprüfung des entworfenen Modells herangezogene Konzept der Membranfluidität einigen kritischen Anfragen ausgesetzt werden. In natürlichen Membranen bilden die Lipide sehr wahrscheinlich kein homogenes Gemisch, in dem die Geschwindigkeit der lateralen Diffusion allein durch die Viskosität des hydrophoben Membraninneren bestimmt wird. Wechselwirkungen im Bereich der hydrophilen Kopfgruppen und in der Grenzschicht zwischen hydrophilem und hydrophobem Anteil des Membranverbands, wo ohnehin die einzelnen Segmente der Lipidmoleküle am stärksten in ihrer Beweglichkeit eingeschränkt sind (137, 74), dürften die laterale Diffusionsgeschwindigkeit ebenso beeinflussen, wie das Ausmaß von Membranbereichen im Gelzustand (laterale Phasentrennung) und eine eventuelle Fernordnung der Membran. Die Fluoreszenzdepolarisation von DPH gibt jedoch nur Auskunft über die Fluidität im hydrophoben Membraninneren (vgl. Abschnitt 6.6.1.), so daß man nur einen von mehreren Faktoren berücksichtigt und nicht von einer strengen Korrelation zwischen dieser Membranfluidität und der lateralen Diffusionsgeschwindigkeit ausgehen kann (vgl. z.B. 219, 100). Wirklich verlässliche Auskunft über die Geschwindigkeit der lateralen Diffusion unter verschiedenen, die Membran fluidisierenden Bedingungen könnte nur mit Hilfe fluoreszierender Gangliosidderivate und Photobleichtechniken erhalten werden (vgl. Abschnitt 4.4.1.).

5.5. Ausblick auf die physiologische Bedeutung der vorgestellten Ergebnisse

Die dargelegten Modellvorstellungen über enzymatische Reaktionen in Membranen und die sich daran anschließenden spekulativen Überlegungen berühren viele, biologisch äußerst wichtige Eigenschaften natürlicher Membranen. So ist das Problem der "Latenz" bzw. der Regulation membrangebundener Enzyme, die wie die membrangebundene Sialidase Bestandteile der gleichen Membran umsetzen, im wahrsten Sinne des Wortes eine "Existenzfrage" für biologische Membranen. Hühnererythrocyten enthalten z.B. eine latente Sphingomyelinase, die bei einer Lyse aktiviert werden kann und dann mit einer Halbwertszeit von nur 10 min (!) das membraneigene Sphingomyelin spaltet (196). Nun würde zwar die Membranstruktur ohne die höher sialylierten Ganglioside nicht zusammenbrechen und auch die Aktivität der membrangebundenen Sialidase würde nur bei saurem pH-Wert und stark erhöhter Membranfluidität ähnliche Werte erreichen (s. Abschnitt 2.3.1. und 4.4.2.), doch dürften

die Ganglioside andere wichtige, wenn auch zur Zeit noch spekulative Funktionen im Membranverband haben und ein unkontrollierter Kreislauf von Desialylierung und Resialylierung (durch die Sialyltransferase der synaptischen Membranen, vgl. Einleitung) wäre sicherlich nicht sinnvoll. Es erschiene daher recht plausibel, wenn die Zelle, ebenso wie sie die meisten ihrer verdauenden Enzyme in die Lysosomen verpackt, wo sie ihre Aufgabe ohne Schaden für die Zelle erfüllen können, auch die membranständigen, lytischen Enzyme, wie z.B. die Sialidase, in bestimmten, funktionellen Membranbereichen abgesondert hielte, damit sie dort in genau geregelterm Umfang die Membranbestandteile verstoffwechseln.

Neben der beobachteten Latenz der Sialidase in frisch präparierten mikrosomalen Membranen liefern die durchgeführten Versuche auch noch andere Hinweise auf mögliche Regulationsmechanismen für die Sialidaseaktivität. Neben dem hemmenden Effekt bereits niedriger Ca^{2+} -Konzentrationen (1 bis 5 mM) auf den Gangliosidumsatz (s. Abschnitt 2.4.3., vgl. auch 218) bietet insbesondere das auffällige pH-Profil der Sialidase dafür Ansatzpunkte. Bei genauerer Analyse erweist sich nämlich das mit dem radiometrischen Enzymtest erhaltene, ausgeprägte pH-Optimum bei pH 3.5 als Zusammenspiel mehrerer Faktoren, die teilweise auch in den Besonderheiten der membrangebundenen Enzymatik begründet sind (s. Abschnitt 2.4.1.). Bezieht man die Sialidaseaktivität auf das tatsächliche Angebot an Gangliosidsubstrat in der Membran, so zeigt sich, daß die Sialidase bei höheren pH-Werten noch mit fast halbmaximaler Geschwindigkeit arbeitet und die Aktivitätsgrenzen bei pH 3 und 7 von den Stabilitätsgrenzen des Enzyms markiert werden (s. Abschnitt 2.2.3.). Der Grund dafür, daß mit wasserlöslichen Substraten die Umsatzraten zwischen pH 5 und 7 relativ zum Maximum demgegenüber geringer ausfielen, könnte in der mit steigendem pH zunehmend negativen Membranladung liegen, die - wie bereits diskutiert - die effektive Konzentration der wasserlöslichen Substrate an der Membranoberfläche erniedrigt. Die erarbeiteten Resultate legen daher nahe, daß die membrangebundene Sialidase natürlicherweise in schwach saurer Umgebung vorliegt, da sie dann maximal stabil ist und immer noch knapp die halbe Maximalaktivität aufweist. Hier sei auch nochmals auf den isoelektrischen Punkt der solubilierten Sialidase bei pH 6 hingewiesen (s. Abschnitt 2.5.3.). Dies schließt aber nicht aus, daß eine Aktivierung durch kurzzeitige pH-Verschiebungen ins Saure bei der biologischen Funktion der Sialidase eine Rolle spielen könnte.

Interessant erschiene in diesem Zusammenhang eine Untersuchung zum Wechselspiel zwischen der membrangebundenen Sialidase und der Sialyltransferase, die ja in der gleichen Membran vorkommen (vgl. Einleitung) und bei pH 6.0 bis 6.6 optimal arbeiten soll (187). Enthalten die verwendeten mikrosomalen Membranen Sialyltransferaseaktivität? Wenn ja, wird vielleicht ein Kreislauf von De- und Resialylierung - auf den es gewisse Hinweise gibt (296) - durch eine Kompartimentierung der Membran (Fernordnung) unter Kontrolle gebracht, die sich durch Einfrieren und Auftauen aufheben läßt? Eine Beantwortung dieser Fragen ließe eventuell ein tieferes Verständnis der funktionellen Gliederung neuronaler Membranen zu.

Mit der Geschwindigkeit der lateralen Diffusion stünde noch ein weiteres Instrument zur Verfügung, über das die Aktivität der membrangebundenen Sialidase gegenüber Gangliosidsubstraten reguliert werden könnte. Inwieweit dies natürlicherweise von Bedeutung ist, muß aber der Spekulation überlassen bleiben. Immerhin fanden Klemm und Engen (113) im Gehirn von Ratten nach Gabe von Äthanol (2 g/kg Körpergewicht) einen um 10 bis 20 % erniedrigten NeuAc-Gehalt, der auf eine mögliche biologische Relevanz der in der vorliegenden Arbeit gezeigten Steigerung des Gangliosidabbaus infolge einer erhöhten Membranfluidität hindeuten könnte. Ähnliche Befunde zur Bedeutung der lateralen Diffusion für die Geschwindigkeit enzymatisch katalysierter Reaktionen in Membranen konnten auch von anderen Arbeitsgruppen an so wichtigen Vorgängen wie dem Elektronentransport in mitochondrialen Membranen (Ü 68, 222) und den lichtinduzierten ersten Schritten des Sehvorgangs (139) erhoben werden.

Darüber hinaus vermuten manche Autoren (261, 180), daß der Mechanismus der Anästhesie über eine Einlagerung der Anästhetika in hydrophobe Membranbereiche und eine dadurch erhöhte Membranfluidität verläuft. Oder es wird angenommen, Narkotika würden sich in die - wie bereits erwähnt - besonders rigide Grenzschicht zwischen den hydrophilen Kopfgruppen der Lipide und dem hydrophoben Membraninneren einlagern (107, 246, 153). Dort könnten sie den Zusammenhalt der Membranbausteine schwächen und damit sowohl laterale Phasentrennungen zugunsten fluider Domänen mit gemischter Zusammensetzung verschieben (Aufschmelzen von Clustern, 61) als auch Lipid-Protein-Wechselwirkungen stören (133). Über alle diese Mechanismen würde dann hypothetisch die Funktion des Nervensystems beeinträchtigt, z.B. durch eine Veränderung der Durchlässigkeit des Na^+ -Kanals oder der Transmitterfreisetzung an Synapsen (s. z.B. 261, Ü 197).

Nun stellen die neuronale Sialidase und ihre natürlichen Substrate, die Ganglioside, spezifische Bestandteile synaptischer Membranen dar (s. Einleitung), so daß sich die Frage erhebt: Können die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit Hinweise geben, inwieweit die in vielen In-Vitro-Studien zur Anästhesie als Modellanästhetika verwendeten primären Alkohole bereits bei anästhetisch relevanten Konzentrationen Vorgänge in neuronalen Membranen zu beeinflussen vermögen? In Tab. 17 ist die anästhetische Potenz der primären Alkohole Methanol bis n-Octanol der durch diese Alkohole verursachten Stimulierung der sialidasekatalysierten Gangliosidspaltung gegenübergestellt. Schon Alkoholkonzentrationen, die die Reizleitung im Ischiasnerv des Frosches blockieren, konnten den Gangliosidumsatz um bis zu fast 50 % steigern. Damit soll nun nicht behauptet werden, die membrangebundene Sialidase des Säugerhirns habe unmittelbar etwas mit dem Mechanismus der Anästhesie zu tun. Die Konzentrationen für allgemeine Anästhesie (20, 188) liegen ohnehin um einen Faktor 4 bis 10 niedriger als diejenigen für die Blockierung der Reizleitung im Ischiasnerv. Aber der Vergleich zeigt, daß schon anästhetisch wirksame Agenskonzentrationen die Geschwindigkeiten membrangebundener Reaktionen verändern können, vermutlich vermittelt durch eine geänderte Verfügbarkeit membrangebundener Reaktionspartner. Ob dabei eine erhöhte laterale Diffusionsgeschwindigkeit oder eine Störung der Nah- und Fernordnung der Membran die entscheidende Rolle spielt, muß dahingestellt bleiben.

In Tab. 17 fällt ein Sprung in der stimulierenden Wirkung zwischen den kurzkettigen Alkoholen mit bis zu vier C-Atomen und den längerkettigen Alkoholen auf. Er kommt in Abb. 38 b (Abschnitt 4.4.2.) noch deutlicher zum Ausdruck und könnte einer Beachtung wert sein. Nach Jain und Wu (Ü 101) lagern sich die kurzkettigen Alkohole in das hydrophobe Innere von Membranen ein, während die längerkettigen Alkohole den zunehmend hydrophoben Grenzbereich bevorzugen, mit der Hydroxylgruppe in der Glycerinregion und der Kohlenwasserstoffkette parallel zu den Fettsäureketten der Phospholipide (vgl. auch 115). Offenbar ist die Fluoreszenzdepolarisation von DPH, die nur die Fluidität im Membraninneren widerspiegelt, unempfindlich für die Unterschiede im Einlagerungsort (s. Abb. 37 b in Abschnitt 4.4.1.), wohl aber die Umsatzgeschwindigkeit für Gangliosid G_{D1a} . Diese Beobachtung unterstreicht möglicherweise die besondere Bedeutung, die der Grenzschicht zwischen hydrophilem und hydrophobem Membranbereich für die laterale Diffusion von Membranbestandteilen zukommen könnte. Wie bereits erwähnt,

Tab. 17

Vergleich der anästhetischen Potenz der primären Alkohole Methanol bis n-Octanol mit ihrer Fähigkeit, den Umsatz von Gangliosid G_{D1a} durch die membrangebundene Sialidase zu beschleunigen.

In der Tabelle sind die Alkoholkonzentrationen aufgeführt, die für eine Blockierung der Reizleitung im Ischiasnerv des Frosches benötigt werden (Ü 230), sowie die bei diesen Konzentrationen ermittelten Umsatzraten für Gangliosid G_{D1a} , die den Daten zu Abb. 38 in Abschnitt 4.4.2. entnommen wurden. Als Bezugswert diente der Umsatz in Abwesenheit von Alkohol. Die mit * gekennzeichnete Alkoholkonzentration wurde aus einer logarithmischen Auftragung der Literaturdaten gegen die Kettenlänge der Alkohole interpoliert.

	Konzentration für Reizleitungsblock	Gangliosid G_{M1} freigesetzt [% des Bezugswertes]
Methanol	2.4 M	112
Äthanol	0.5 M	107
n-Propanol	218 mM	115
n-Butanol	68 mM	122
n-Pentanol	21 mM	141
n-Hexanol	6 mM	146
n-Heptanol	1.8 mM	142
n-Octanol	0.4 mM*	117

wurde in jüngster Zeit gerade dieser Membranbereich als Angriffsort für Narkotika ins Gespräch gebracht (19, 107, 246, 153).

Die Untersuchung solcher Phänomene und eine genauere Analyse der hinter membrangebundenen Reaktionsabläufen stehenden Mechanismen fiel natürlich wesentlich leichter, wenn man die Sialidase aus den mikrosomalen Membranen herauslösen, reinigen und wieder in Membranen definierter Zusammensetzung einbauen könnte, so daß die vereinfachende Sichtweise des entworfenen Modells wirklich zuträfe; oder aber, wenn man in natürlichen Membranen mit Hilfe fluoreszenzmarkierter Ganglioside und der Photobleichtechnik die Geschwindigkeit der lateralen Diffusion direkt messen könnte. Vorarbeiten sowohl zu einer Enzymreinigung als auch zur Synthese markierter Gangliosidderivate wurden bereits geleistet (s. Abschnitt 2.5.3. und 2.3.5.2.) und erscheinen

erfolgversprechend. Doch auch ohne solche verfeinerten Methoden, die späteren Versuchen vorbehalten bleiben müssen, konnten wichtige Informationen über den Ablauf enzymatisch katalysierter Reaktionen in Membranen im allgemeinen und über die Wechselwirkung der membrangebundenen Sialidase mit ihren Substraten im besonderen gewonnen werden, die immerhin den Vorteil haben, daß sie mit Membranen und Gangliosidsubstraten in weitgehend natürlichem Zustand erhalten wurden und daher verlässlicher über die biologischen Verhältnisse Aufschluß geben.

6. Materialien und Methoden

6.1. Materialien

6.1.1. Geräte

Druckstabile Inkubationsgefäße (Autoklaven, stabil bis mind. 50 atm) von Herrn Pastor, mechanische Werkstätte des Max-Planck-Instituts für Psychiatrie, München.

Adapter für den Rotor SW 25 der Fa. Beckmann von der mechanischen Werkstätte der chemischen Institute der Universität Bonn.

Polyäthylen-Reaktionsgefäße Nr. 3810, Schüttelmixer Nr. 5432 und Tischzentrifuge Nr. 5412 von Eppendorf Gerätebau, Hamburg.

Vortex-Genie-Mixer von Scientific Industries, New York, USA.

Ultraschallgerät Sonifier B-12 mit regelbarer Schalleistung von Branson Sonic Power Company, Danbury, Connecticut, USA.

Betacamera BF 290 B von Berthold, München.

Microviscosimeter MV-1a von Elscint GmbH, Wiesbaden.

Kühlzentrifugen nebst Rotoren von Sorvall-DuPont, Bad Nauheim.

Ultrazentrifugen nebst Rotoren von Beckmann, München.

pH-Meter mit Mikro-Saagelektrode E 5021a von Radiometer, Kopenhagen, Dänemark.

Densitometer CS-910 mit Integrator C-R1A von Shimadzu, Düsseldorf.

Schüttelwasserbad von GFL, Burgwedel.

6.1.2. Chemikalien

Disialogangliotetraose: Freundliche Gabe von G. Schwarzmann (vgl. 227).

α -Azidostearinsäure-N-hydroxysuccinimidylester: Freundliche Gabe von J. Schubert (vgl. 225).

9-Doxylstearinsäure: Freundliche Gabe von P. Hoffmann-Bleihauer (vgl. 87, 150).

NeuAc-2-en: Freundliche Gabe von R. Veh, Bochum.

$[^3\text{H}]$ -NaBH₄ von Amersham Buchler GmbH, Braunschweig.

$[^3\text{H}]$ -Sialyllactit (= Lactitol-1- $^3\text{H}(\text{N})$ -Neuraminlactitol) von New England Nuclear, Boston, USA.

Sialyllactose und Trypsin aus Rinderpankreas von Boehringer, Mannheim.

Rohes Gangliosidgemisch aus Rinderhirn, 4-MU-NeuAc und Triton X-100 von Koch-Light Laboratories, Colnbrook, Großbritannien.

Anionenaustauscher AG 1-X8 (200-400 mesh, Formiatform) von Bio-Rad Laboratories GmbH, München.

DEAE-Cellulose DE-52 von Whatman, England.

DEAE-Sepharose CL-6B (überführt in die Acetatform nach 97) und SP-Sephadex (überführt in die H^+ -Form) von Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden.

Iatrobeads 6RS-8060 von Iatron Lab., Tokyo, Japan.

Rialuma von Baker, Niederlande.

Unisolve 100 von Zinsser, Frankfurt/Main.

DPH, n-Octyl- β -D-glucopyranosid, Cholesterin, Eilecithin Typ III E, Dithioerythrit, Chymotrypsin aus Rinderpankreas und Trypsininhibitor aus Sojabohnen von Sigma Chemie GmbH, München.

Ampholine von LKB Instruments GmbH, Gräfelfing.

Heptanol, puriss. von Fluka AG, Buchs, Schweiz.

Hexanol und Octanol, puriss., von C. Roth OHG, Karlsruhe.

Lachgas (N_2O) 2.5 von Linde AG, München.

Kieselgel 60 und Kieselgel-60-Fertigplatten, sowie alle übrigen Chemikalien, p.a. oder höchster erhaltlicher Reinheitsgrad, von Merck, Darmstadt.

Wasser wurde ausschließlich in entionisierter Form verwendet.

6.1.3. Reinigung von [3H]-Sialyllactit

Käufliches [3H]-Sialyllactit wurde wie beschrieben (214) durch Säulenchromatographie an Anionenaustauscher AG 1-X8 gereinigt (radioaktive Verunreinigungen unter 0.3 %) und mit unmarkierter Sialyllactose auf eine spezifische Radioaktivität von etwa 0.5 Ci/mol gebracht. Die Gehaltsbestimmung anhand der enthaltenen NeuAc erfolgte colorimetrisch mit Thio-barbitursäure (279). Die wässrigen Lösungen wurden tiefgefroren aufbewahrt.

6.1.4. Darstellung von [3H]-Gangliosid G_{D1a}

Käufliches rohes Gangliosidgemisch aus Rinderhirn wurde durch eine Kombination von Säulenchromatographien an Kieselgel 60 (249), DEAE-Sepharose (97) und Iatrobeads 6RS-8060 (2, 161) in seine Bestandteile aufgetrennt und daraus dünnschichtchromatographisch sauberes Gangliosid G_{D1a} gewonnen.

Das Gangliosid wurde nach den Angaben von G. Schwarzmann (226) durch katalytische Hydrierung der olefinischen Doppelbindung im Ceramidanteil mit $[^3\text{H}]$ - NaBH_4 tritiummarkiert, erneut säulenchromatographisch gereinigt (radioaktive Verunreinigungen unter 0.1 %) und mit unmarkiertem Gangliosid G_{D1a} je nach Bedarf auf eine gewünschte spezifische Radioaktivität zwischen 5 und 30 Ci/mol eingestellt.

Die dünnschichtchromatographische Analyse der einzelnen Fraktionen erfolgte an Kieselgel-60-Fertigplatten mit Hilfe des Laufmittels Chloroform/Methanol/0.22 % $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 55:45:10 (3) und des Kägi-Miescher-Anfärbereagens (0.4 % Anisaldehyd in Eisessig/konz. Schwefelsäure 49:1). Die Gehalte der Reingangliosidfraktionen wurden anhand der enthaltenen Sialsäure nach der modifizierten Methode (159) von L. Svennerholm (247) bestimmt. Die Reinganglioside wurden in wässriger Lösung unter Zusatz von ca. 1 mM Ammoniak bei -20°C gelagert.

6.1.5. Synthese eines tritium- und spinmarkierten Gangliosid- G_{D1a} -Analogons ($[^3\text{H}]$ -Doxyl- $^3\text{G}_{\text{D1a}}$ ", zum Synthesepan vgl. 163, 227)

Ausgehend vom ceramidfreien Zuckerrest des Gangliosids G_{D1a} (Disialogangliotetraose) wurde in Anlehnung an die Arbeit von Micheel et. al. (158), jedoch direkt in flüssigem Ammoniak anstatt in Methanol, bei 50°C im verschlossenen Rohr dessen Osimin dargestellt. Ohne dieses zu isolieren, wurde es in der Kälte in flüssigem Ammoniak mit $[^3\text{H}]$ - NaBH_4 zum Amin reduziert (vgl. 169). Man ließ auf Raumtemperatur kommen und alle flüchtigen Bestandteile abdampfen. Der weiße Rückstand wurde in Isopropanol/Wasser 5:1 aufgenommen und säulenchromatographisch an DEAE-Sepharose CL-6B gereinigt (Elution mit 50 mM wässrigem Pyridinacetat). Nach Gefriertrocknung wurde die freie Amino-Gruppe des so isolierten 1-Deoxy-1-amino- $[^3\text{H}]$ -disialogangliotetraits in Gegenwart von etwas NaHCO_3 in Tetrahydrofuran/Wasser 1:1 mit dem N-Hydroxy-succinimidylester von α -Azidostearinsäure zum 1-Deoxy-1-(α -azidostearoylamino)- $[^3\text{H}]$ -disialogangliotetrait umgesetzt. Nach dessen säulenchromatographischer Reinigung an DEAE-Cellulose (Elution mit 0.1 M Ammoniumacetat in Methanol) wurde die Azidgruppe katalytisch an feinverteiltem Platin hydriert und das entstandene 1-Deoxy-1-(α -aminostearoylamino) - $[^3\text{H}]$ -disialogangliotetrait säulenchromatographisch an DEAE-Cellulose (Elution mit 50 mM Ammoniumacetat in Methanol) und SP-Sephadex, H^+ -Form, (Elution mit 1% (v/v) Pyridin in Chloroform/Methanol/Wasser 30:60:8) gereinigt. Die freie α -Aminogruppe

am Stearoyl-Rest ließ man nun mit dem N-Hydroxysuccinimidylester von 9-Doxylstearinsäure zum fertigen, doppelt markierten Gangliosid-G_{D1a}-Analogon [³H]-Doxyl-"G_{D1a}" abreagieren. Nach säulenchromatographischer Reinigung über SP-Sephadex (H⁺-Form, Elution wie oben), Iatrobeads 6RS-8060 (Elution mit 2 % (v/v) Wasser in Chloroform/Methanol 1:1) und DEAE-Sepharose (Elution mit Chloroform/Methanol/0.3 M Ammoniumacetat 3:7:1) wurde das dünn-schicht-chromatographisch saubere [³H]-Doxyl-"G_{D1a}" (radioaktive Verunreinigungen unter 1 %) gegen Wasser dialysiert (65) und tiefgefroren aufbewahrt.

6.2. Präparation der membrangebundenen Sialidase

6.2.1. Anreicherung synaptischer Plasmamembranen

Angereicherte synaptische Plasmamembranen wurden aus Kalbshirncortex gewonnen (modifiziertes Verfahren nach 104) und standen im Arbeitskreis zur Verfügung (180, 181, 1).

6.2.2. Anreicherung mikrosomaler Membranen

Auf dem Schlachthof wurde aus einem unmittelbar vorher geschlachteten Kalb das Hirn entnommen und sofort in Eis gekühlt. Die weitere Aufarbeitung erfolgte bei 0 bis 4° C und wurde innerhalb eines Tages beendet. Das Hirn wurde zuerst von der Hirnhaut befreit und dann das graue Cortexgewebe von der weißen Hirnsubstanz mit einem Skalpell abgetrennt. Das so erhaltene Cortexgewebe wurde mit einem Teflon-Glas-Homogenisator (Spaltbreite 0.15 mm) bei 800 UpM in 3 min zu einem 10%igen (w/v) Homogenat in 0.32 M Saccharose (gepuffert mit 10 mM Tris/HCl pH 7.2) verarbeitet. Das Homogenat wurde zur Entfernung aller schwereren Zellbestandteile 30 min bei 13 000 g (GSA-Rotor, Sorvall-DuPont) zentrifugiert. Aus dem erhaltenen Überstand wurden in einer Stunde bei 100 000 g (Rotor Ti-45, Beckmann) die mikrosomalen Membranen sedimentiert und durch jeweiliges Resuspendieren und einstündiges Abzentrifugieren bei 100 000 g noch zweimal mit 10 mM Tris/HCl pH 7.2 saccharose-frei gewaschen. Die so erhaltenen gereinigten Mikrosomen wurden in Form einer ca. 20 - 30%igen Suspension in 10 mM Tris/HCl pH 7.2 in Polyäthylen-gefäßen bei -20° C aufbewahrt.

In Anlehnung an die Prozedur zur Anreicherung synaptischer Plasmamembra-

nen wurde bei späteren Präparationen mikrosomaler Membranen (M.D bis M.G) statt des 10 mM Tris/HCl-Puffers ein 0.5 mM Puffer verwendet.

6.2.3. Leitenzyme

Die Bestimmung der Leitenzyme erfolgte in Zusammenarbeit mit E. Acevedo wie beschrieben (1).

6.2.4. Proteinbestimmung

Die Proteingehalte der subzellulären Fraktionen aus Kalbshirn wurden nach Lowry et. al. (143) bestimmt. Um auch membrangebundene Proteine quantitativ richtig zu erfassen, wurde der eigentlichen Proteinbestimmung eine einstündige alkalische Hydrolyse in 1 N NaOH bei 100° C vorgeschaltet. Das Hydrolysat wurde dann der Farbreaktion mit dem Cu^{2+} - und dem Folin-Phenol-Reagens unterworfen und nach 30 min die Extinktion bei 540 nm gegen einen Leerwert gemessen. Als Proteinstandard wurde jeweils Albumin aus Rinderserum verwendet.

6.3. Bestimmung der Sialidaseaktivität

6.3.1. 4-MU-NeuAc als Substrat

Die Ansatzmischung (zur Zusammensetzung s. die Legenden zu den einzelnen Abbildungen bzw. Tabellen) wurde in Polyäthylen-Reaktionsgefäßen auf Eis bereitet, wobei die Enzympräparation erst kurz vor Fertigstellung der Ansätze zugegeben wurde. Nach gründlichem Mischen (Vortex-Genie-Mixer) wurden die Ansätze bei 37° C inkubiert (Schüttelinkubator). Die enzymatische Reaktion wurde anschließend durch Eintauchen in ein Eisbad und sofortige Zugabe des dreifachen Ansatzvolumens an Stopplösung (0.2 M Na_2CO_3 /0.2 M Glycin) beendet und ein evtl. entstandener Proteinniederschlag in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert. Das freigesetzte 4-Methylumbelliferon wurde im Fluorimeter mit Durchflußküvette anhand seiner Fluoreszenz bei 440 nm unter Anregung bei 365 nm (Hg-Dampf-Lampe) bestimmt. Als Standard diente eine 4-Methylumbelliferon-Lösung bekannter Konzentration (0.5 bis 2.5 μM) in Stopplösung. Falls die Fluoreszenz der Ansätze zu hoch war, wurde mit weiterer Stopplösung passend verdünnt.

Kontrollansätze wurden unter sonst identischen Bedingungen mit hitze-inaktivierter Sialidasepräparation (10 min 100° C) gefahren und die so erhaltenen Blindwerte von den jeweiligen Meßwerten abgezogen. Dabei zeigte sich, daß das 4-MU-NeuAc insbesondere bei pH-Werten unter 3.5 eine nicht unerhebliche, nichtenzymatische Hydrolyse erleidet, deren Geschwindigkeit außer vom pH-Wert und der Inkubationsdauer auch von der Ionenstärke und anderen Ansatzbedingungen beeinflusst wird.

Die korrigierte Sialidaseaktivität wurde in der Regel in nmol umgesetztes Substrat je Stunde und je mg mikrosomalen Proteins ausgedrückt ($\frac{\text{nmol}}{\text{h} \cdot \text{mg}}$).

6.3.2. [³H]-Sialyllactit als Substrat

Die Ansätze (0.1 ml Gesamtvolumen) wurden wie im vorangehenden Abschnitt beschrieben auf Eis bereitet und eine Minute lang gründlich gemischt (Vortex-Genie-Mixer oder Schüttelmixer). Nach einstündiger Inkubation bei 37° C wurde die enzymatische Reaktion durch Eintauchen in ein Eisbad und Zugabe von 0.72 ml Chloroform/Methanol/2.5 M Ammoniak 4 : 1 : 0.05, sowie 0.5 ml 1 mM Lactit gestoppt. Das zweiphasige System wurde intensiv gemischt und zur schnellen Trennung der Phasen in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. 0.5 ml der wässrigen Oberphase wurden auf eine kleine Anionenaustauschersäule (AG 1-X 8 in einer Pasteurpipette, Ø 5 mm, 1 ml Bettvolumen) aufgetragen. Das Reaktionsprodukt [³H]-Lactit wurde mit 2 ml einer 1 mM Lactitlösung eluiert, anschließend das restliche, nicht umgesetzte [³H]-Sialyllactit mit 2 ml einer 0.5 M Natriumformiatlösung. Der Radioaktivitätsgehalt beider Fraktionen wurde nach Mischen mit 16 ml Unisolve 100 im Flüssigkeitsszintillationszähler bestimmt und daraus der relative Abbau r berechnet:

$$r = \frac{[\text{³H}]\text{-Lactit}}{[\text{³H}]\text{-Lactit} + [\text{³H}]\text{-Sialyllactit}}$$

Durch Multiplikation mit der eingesetzten Substratmenge erhält man daraus die Menge an enzymatisch freigesetzter NeuAc.

Bezüglich der Kontrollansätze gilt das im vorausgehenden Abschnitt Gesagte entsprechend. Zusätzlich zu beachten ist, daß allzu hohe Salzkonzentrationen im Ansatz die Bindung von Sialyllactit an den Ionenaustauscher beeinträchtigen können.

6.3.3. $[^3\text{H}]$ -Gangliosid G_{D1a} als Substrat

Die Ansätze wurden wie in Abschnitt 6.3.1. beschrieben auf Eis bereitet und eine Minute lang gründlich gemischt (Vortex-Genie-Mixer oder Schüttelmixer). Nach erfolgter Inkubation bei 37°C wurde die enzymatische Reaktion durch Eintauchen in ein Eisbad gestoppt. Die Ansätze wurden wie folgt auf vorbereitete, kleine Anionenaustauschersäulen (DEAE-Sepharose, Chlorid- oder Acetat-Form, in einer Pasteurpipette, $\varnothing$ 5 mm, 0.5 ml Bettvolumen, gewaschen mit 2 ml Methanol) aufgetragen, wobei zwischendurch jeweils vollständiges Einsickern abgewartet wurde: Erst 100 μl Wasser, dann der Ansatz, dann wieder 100 μl Wasser. Das Reaktionsprodukt $[^3\text{H}]$ -Gangliosid G_{M1} wurde mit 4 ml einer 15 mM Ammoniumacetatlösung in Methanol eluiert, anschließend das restliche, nicht umgesetzte $[^3\text{H}]$ -Gangliosid G_{D1a} mit 4 ml einer 100 mM Ammoniumacetatlösung in Methanol. Nach Mischen mit 12 ml Rialuma wurde, wie im vorausgehenden Abschnitt beschrieben, der Radioaktivitätsgehalt beider Fraktionen bestimmt und über den relativen Abbau r die enzymatisch freigesetzte Menge an NeuAc berechnet. Bezüglich der Kontrollansätze gilt das in Abschnitt 6.3.1. Gesagte entsprechend.

Anmerkungen:

Wie bereits in Abschnitt 2.1.2.3. ausgeführt, wurde das hier beschriebene Verfahren zur Substrat/Produkt-Trennung ausgehend von einer Methode zur quantitativen Isolierung von Reingangliosiden (97) entwickelt. Aus den dazu notwendigen, umfangreichen Versuchsreihen sollen an dieser Stelle noch einige der wichtigsten Ergebnisse herausgegriffen werden:

- 1) Die oben beschriebene Prozedur zum Auftragen der Ansätze auf die Säulchen hat sich als optimal erwiesen, insbesondere, wenn die Ansätze größere Salzmenge enthielten. Offenbar bleibt das Gangliosidsubstrat, das in wässriger Lösung in aggregierter bzw. an die sialidasehaltigen Membranen gebundener Form vorliegt, sofort am Säulenbeginn hängen, während die im Ansatz enthaltenen Salze, die die spätere Trennung von nicht umgesetztem Substrat und entstandenem Produkt stören würden, in der Säule weiterwandern. Erst bei Wechsel des Lösungsmittels auf Methanol lösen sich die Gangliosidaggregate auf, und die Ganglioside binden monomer an den Anionenaustauscher.

- 2) Das ursprüngliche Verfahren zur Gangliosidreinigung benutzte DEAE-Sepharose in der Acetatform, die aus der käuflichen Chloridform erst hergestellt werden mußte (97). Dies wurde anfangs auch so beibehalten, bis sich in späteren Versuchen herausstellte, daß beide Formen bei der oben beschriebenen Versuchsdurchführung in ihrer Trennleistung gleichwertig waren.
- 3) Das angegebene Bettvolumen für die Trennsäulen bezieht sich auf die routinemäßigen Testbedingungen mit Ansatzvolumina bis 0.2 ml, Ionenstärken bis 150 mM und Gangliosidmengen bis 60 nmol/Ansatz. Wurden diese Werte überschritten oder waren insbesondere größere Mengen Detergens in den Ansätzen, so wurde das Bettvolumen auf bis zu 1.25 ml erhöht und/oder die Ansätze aufgeteilt. In Kontrollversuchen wurde dann jeweils durch fraktionierte Elution der Säulchen die ausreichende Trennung von Gangliosid G_{M1} und G_{D1a} überprüft.
- 4) Versuche zur Wiederfindung des auf die Säulchen aufgetragenen Gangliosids zeigten, daß beim oben beschriebenen Verfahren über 95 % der aufgetragenen Radioaktivität auch wieder eluiert wurden.
- 5) Eine Schlüsselstellung im beschriebenen Trennverfahren nimmt die Ammoniumacetatkonzentration des ersten Elutionsmittels ein. Sie muß einerseits so hoch sein, daß das Gangliosid G_{M1} quantitativ und in einem praktikablen Elutionsvolumen eluiert wird, und andererseits so niedrig, daß das Gangliosid G_{D1a} völlig von der Säule zurückgehalten wird. Abb. 45 zeigt, daß hierfür eine Konzentration von 15 mM optimal geeignet ist, und gibt einen Eindruck von der Trennleistung der kleinen Säulen unter den oben beschriebenen Elutionsbedingungen.

6.3.4. [³H]-Gangliosid- G_{D1a} -haltige Lipidvesikel als Substrat

Lipidvesikel, bestehend aus 10 mol-% [³H]-Gangliosid G_{D1a} , 65 mol-% Eilecithin und 25 mol-% Cholesterin, wurden wie folgt hergestellt: Eine Mischung aus 1.25 mg Eilecithin, 0.24 mg Cholesterin und 0.25 µmol [³H]-Gangliosid G_{D1a} in organischer Lösung wurde unter Überblasen mit Stickstoff und leichtem Erwärmen zur Trockne eingedampft, der Rückstand in 0.3 ml Chloroform/Methanol 1 : 1 aufgenommen und die Lösung nach gründlichem Mischen erneut zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde mit 1 ml 50 mM Formiatpuffer pH 4.0 versetzt und unter Eiskühlung und Begasen mit Stickstoff zehn Minuten lang

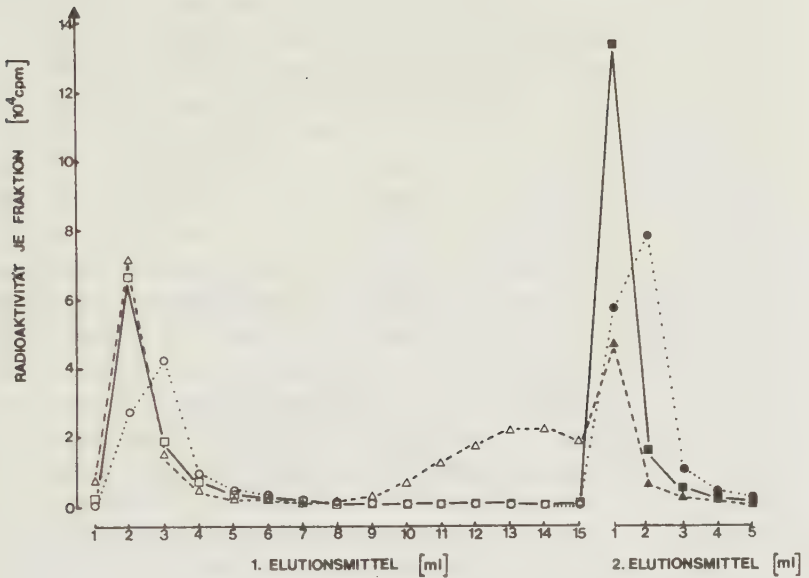


Abb. 45

Fractionierte Elution von Gangliosid G_{M1} und G_{D1a} von DEAE-Sepharose mit Ammoniumacetat in Methanol

Etwa gleiche Radioaktivitätsmengen an $[^3H]$ -Gangliosid G_{M1} und G_{D1a} wurden als Gemisch in methanolischer Lösung auf je eine kleine Säule mit DEAE-Sepharose (Acetatform, 0.5 ml Bettvolumen) aufgetragen. Es wurde mit 3 ml Methanol nachgespült und dann mit methanolischer Ammoniumacetatlösung der in der Zeichenerklärung angegebenen Konzentration eluiert (1. Elutionsmittel, insgesamt 15 ml). Anschließend wurden alle Säulen in gleicher Weise mit 100 mM Ammoniumacetat in Methanol eluiert (2. Elutionsmittel, insgesamt 5 ml). Die beiden Elutionsmittel wurden dabei in 1-ml-Schritten auf die Säulen aufgetragen und auch die Eluate in Fraktionen zu 1 ml aufgefangen. Nach Szintillatorzugabe wurde die in den Eluatfraktionen enthaltene Radioaktivität im Flüssigkeitsszintillationszähler gemessen.

- 10 mM Ammoniumacetat
- 15 mM Ammoniumacetat
- △---▲ 20 mM Ammoniumacetat

in Methanol als 1. Elutionsmittel

mit Ultraschall behandelt (Sonifier B-12 mit Mikrospitze, 40 Watt Schallleistung). Die Vesikelsuspension (vgl. 272) wurde 35 min bei 100 000 g (Rotor Ti-50, Beckmann) und 4° C zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und nach Gehaltsbestimmung anhand der Radioaktivität (Wiederfindung etwa 70 %, Rest im Pellet) als Substrat für die membrangebundene Sialidase eingesetzt. Im Übrigen wurden die Tests wie im vorhergehenden Abschnitt beschrieben durchgeführt.

6.3.5. Endogene Ganglioside als Substrat

Die Ansätze (zur Zusammensetzung s. die Legenden zu den einzelnen Abbildungen bzw. Tabellen) wurden in Polyäthylen-Reaktionsgefäßen auf Eis bereitet und gründlich gemischt (Vortex-Genie-Mixer). Nach Inkubation bei 37° C im Schüttelinkubator wurde die enzymatische Reaktion durch Eintauchen in ein Eisbad gestoppt. Die Ansätze wurden im Kühlraum bei 4 bis 6° C auf kleine Anionenaustauschersäulen (DEAE-Sepharose, Acetat-Form, in einer Pasteurpipette, Ø 5 mm, 0.2 ml Bettvolumen, gewaschen mit 2 ml Wasser) aufgetragen. Die Säulen wurden eluiert mit

- a) 1.5 ml einer 0.5 M wässrigen Ammoniumacetatlösung
- b) nacheinander 0.5 ml Wasser, 0.5 ml Aceton, 0.5 ml Chloroform/Methanol 1:1 und 1 ml Chloroform/Methanol/Wasser 3:7:1
- c) 1.5 ml Chloroform/Methanol/0.8 M Ammoniumacetat 3:7:1

Gemäß dünnenschichtchromatographischer Analyse an Kieselgel 60 enthielt Fraktion a) die wasserlöslichen Ansatzbestandteile - also neben den Salzen insbesondere die enzymatisch freigesetzte NeuAc -, Fraktion b) die ungeladenen Lipidbestandteile und Fraktion c) die Ganglioside und andere negativ geladene Lipide der mikrosomalen Membranen. Nur in ungünstigen Fällen (große Ansatzvolumina bei hohen Ionenstärken) wurde ein kleiner Teil der mikrosomalen Membranen während der wässrigen Elution nicht von der Säule festgehalten und gelangte in die Fraktion a).

Zur Bestimmung des Gangliosidgehalts wurde die Fraktion c) unter Überblasen mit Stickstoff und leichtem Erwärmen eingedampft und der Rückstand in 0.2 bis 0.3 ml Wasser aufgenommen. Diese Lösung wurde gefriergetrocknet, und das Lyophilisat in 20 µl Chloroform/Methanol/Wasser 3:7:1 gelöst. Unter Nachspülen mit weiteren 20 µl des gleichen Lösungsmittelgemisches wurde die Lösung auf Kieselgel-60-Fertigplatten mit Konzentrierungszone aufgetragen. Nach dem Ent-

wickeln in Chloroform/Methanol/0.22 % $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 55:45:10 wurde das Dünnschichtchromatogramm spezifisch auf NeuAc-haltige Verbindungen angefärbt (247), indem es mit einer Mischung aus 80 Teilen konzentrierter Salzsäure, 20 Teilen einer 1%igen (w/v) Resorcinlösung und 0.25 Teilen einer 2.5%igen (w/v) Lösung von $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ angesprüht und unter Abdeckung etwa 30 min auf 95° C erhitzt wurde. Die Absorption der blauvioletten Gangliosidflecken bei 580 nm wurde im Densitometer bestimmt und aus den Flächen unter den Peaks anhand von Eichkurven die Menge des jeweiligen Gangliosids bestimmt. Zur Erstellung der Eichkurven wurden bekannte Mengen des Gangliosids G_{D1a} genauso wie oben beschrieben chromatographiert, angefärbt und die ihnen entsprechenden Peakflächen densitometrisch ermittelt. Die Korrelation der Peakflächen mit der Menge an gangliosidgebundener NeuAc war bis etwa 4 nmol linear und flachte dann ab. Die kleinsten mit dieser Methode noch gut bestimmbareren NeuAc-Mengen lagen bei ca. 0.2 nmol, wie auch von anderen Autoren beschrieben (3, 30).

Sollte auch die bei der enzymatischen Reaktion freigesetzte NeuAc bestimmt werden, so wurde Fraktion a) gefriergetrocknet, der Rückstand in ca. 0.2 ml verdünnter Ammoniaklösung (1:1000-Verdünnung einer konzentrierten Ammoniaklösung) aufgenommen und diese Lösung erneut gefriergetrocknet (Entfernung aller als Ammoniumsalze flüchtigen Pufferbestandteile). Das Lyophilisat wurde in 20 µl Wasser aufgenommen und unter Nachspülen mit weiteren 10 µl Wasser auf Kieselgel-60-Fertigplatten aufgetragen. Nach Entwickeln in n-Butanol/Eisessig/Wasser 2:1:1 wurde das Chromatogramm wie oben beschrieben angefärbt und densitometrisch ausgewertet.

6.3.6. Ermittlung der enzymkinetischen Parameter K_M und V_{max}

6.3.6.1. Michaelis-Menten-Gleichung und ihre über die Zeit integrierte Form

Nach der Theorie von Michaelis und Menten (155, 18) folgt die Kinetik einer enzymkatalysierten Reaktion der Gleichung

$$V_o = V_{\text{max}} \cdot \frac{[S]}{K_M + [S]} \quad (\text{Gl. 1 in Abschnitt 3.3.})$$

V_o = Anfangsgeschwindigkeit

V_{max} = maximale Reaktionsgeschwindigkeit bei Substratsättigung

$[S]$ = Substratkonzentration

K_M = Michaelis-Konstante

Zur Bestimmung der beiden Konstanten K_M und $V_{\max}$ wurde mit Hilfe der in den Abschnitten 6.3.1. bis 6.3.3. dargelegten Testverfahren der Substratumsatz durch die membrangebundene Sialidase in Abhängigkeit von der Substratkonzentration gemessen, wobei die Substratkonzentrationen nach Möglichkeit im Bereich von einem Zehntel bis zum Zehnfachen des zu erwartenden Werts für die Michaelis-Konstante K_M variiert wurden, um eine solide Grundlage für die anschließenden Berechnungen zu schaffen (14). Die dabei erhaltenen Meßwerte stellen nun aber keine Anfangsgeschwindigkeiten dar, wie sie eigentlich in Gl. 1 eingesetzt werden müßten, sondern die nach bestimmten Inkubationszeiten ermittelten relativen Abbauwerte r , die dann nach Multiplikation mit der eingesetzten Substratmenge $[S]_0$ eine über die Inkubationszeit t gemittelte Umsatzgeschwindigkeit V_t ergeben:

$$V_t = \frac{r \cdot [S]_0}{t} \quad (\text{Gl. 2})$$

$$\text{wobei } r = \frac{[P]_t}{[S]_0} = \frac{[S]_0 - [S]_t}{[S]_0} \quad (\text{Gl. 3})$$

$[P]_t$ = Konzentration des nach der Zeit t gebildeten Reaktionsprodukts

$[S]_t$ = die nach der Zeit t noch vorhandene Substratkonzentration

Bei nicht zu großen relativen Abbauten r , also nicht zu großen Änderungen von $[S]$ während der Reaktion, kann jedoch V_t als gute Näherung für V_0 angesehen werden und wurde daher zur Bestimmung von K_M und $V_{\max}$ anhand der Gl. 1 und ihrer Umformungen herangezogen (s.u.)

Bei niedrigen Konzentrationen an eingesetztem Gangliosidsubstrat, insbesondere in Gegenwart membranfluidisierender Agentien, wurden aber auch öfter Abbauwerte über 0.5 beobachtet, d.h. mehr als die Hälfte des angebotenen Substrats war umgesetzt worden. Hier ist es nicht mehr statthaft, V_t statt V_0 und $[S]_0$ statt $[S]$ in die Gl. 1 einzusetzen. In diesem Fall wurde für die näherungsweise Bestimmung der enzymkinetischen Konstanten die über die Zeit t integrierte Form der Michaelis-Menten-Gleichung benutzt:

$$V_t = \frac{[S]_0 - [S]_t}{t} = \frac{K_M}{t} \cdot \ln \frac{[S]_t}{[S]_0} + V_{\max} \quad (\text{Gl. 4})$$

Dieses Vorgehen stellt jedoch auch nur einen mangelhaften Kompromiß dar, da bei hohen Abbauwerten auch die der Ableitung der Michaelis-Menten-Gleichung

zugrunde liegende Annahme des "steady state" mit konstanter Konzentration an Enzym-Substrat-Komplex verletzt ist. Die in dieser Arbeit angegebenen Größen K_M und $V_{\max}$ sind daher nur immer die unter den gegebenen Umständen bestmöglichen Näherungswerte.

6.3.6.2. Angewendete Rechenverfahren

Die Berechnung der enzymkinetischen Konstanten K_M und $V_{\max}$ erfolgte durch die optimale Anpassung der gemessenen Wertepaare $[S]_0/V_t$ bzw. r an die theoretischen Kurven nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate mit Hilfe eines elektronischen Rechners. Als zugrunde liegende Gleichungen dienten die Michaelis-Menten-Gleichung (Gl. 1), ihre Umformungen nach Lineweaver und Burk (141)

$$\frac{1}{V_t} = \frac{K_M}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]_0} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (\text{Gl. 5})$$

Hanes (modifiziert, vgl. 14)

$$\frac{1}{r} = \frac{1}{t \cdot V_{\max}} \cdot [S]_0 + \frac{K_M}{t \cdot V_{\max}} \quad (\text{Gl. 6})$$

sowie

$$r = \frac{t \cdot V_{\max}}{K_M + [S]_0} \quad (\text{Gl. 7})$$

und die Umformung von Gl. 4

$$r \cdot [S]_0 = K_M \cdot \ln(1-r) + t \cdot V_{\max} \quad (\text{Gl. 8})$$

Unterlagen die Meßwerte lediglich einer normalen statistischen Streuung, so stimmten die nach den verschiedenen Gleichungen ermittelten Werte für K_M und $V_{\max}$ wie zu erwarten gut überein. In diesem Fall wurde dann jeweils der Mittelwert gebildet, und die angegebene Standardabweichung repräsentiert nicht unmittelbar den statistischen Fehler der Meßserie, sondern die Streuung in den Parameterwerten bei Verwendung der verschiedenen Anpassungsverfahren.

Traten in den Substratabhängigkeiten systematische Fehler auf - wie z.B. Substrathemmung, Substratverluste bei kleinen Konzentrationen durch Wandeffekte, zu hohe Abbauwerte -, so wirkten sich diese unterschiedlich auf die verschiedenen Rechenverfahren aus, mit dem Ergebnis einer starken Streuung in den Werten für die beiden Konstanten. Waren die systematisch abweichenden Wertepaare, wie z.B. im Fall einer Substrathemmung, klar erkennbar, so wurden sie aus der Auswertung herausgenommen und die Konstanten neu berechnet.

Durchweg zu hohe Abbauwerte und die damit verbundene starke Abweichung der dem Enzym durchschnittlich zur Verfügung stehenden Substratkonzentration von der Anfangskonzentration äußerte sich in einer großen Differenz zwischen der nach den Gleichungen 1 und 5 bis 7 und der nach Gleichung 8 berechneten Michaelis-Konstante. In solchen Fällen wurde nur der über die zeitintegrierte Michaelis-Menten-Gleichung (Gl. 8) zustandgekommene Wert berücksichtigt.

6.3.6.3. Einfluß endogener Substrate

Während der Inkubationszeit baut die membrangebundene Sialidase nicht nur die zugesetzten Substrate ab, sondern auch die bereits in den mikrosomalen Membranen vorhandenen. Man mißt aber nur den Umsatz des markierten, zugesetzten Substrats und erhält damit zu kleine Enzymaktivitäten. In kinetischer Hinsicht verhält sich das endogene Substrat wie ein kompetitiver Inhibitor, der einen Teil des Enzyms als Enzym-Inhibitor-Komplex der beobachteten enzymatischen Reaktion entzieht. Nach der klassischen Theorie der Enzymkinetik wird davon lediglich die ermittelte, scheinbare Michaelis-Konstante $K_{M,app}$ beeinflusst, nicht aber V_{max} , gemäß der Gleichung (z.B. 49, 14):

$$K_{M,app} = K_M \cdot \left(\frac{[I]}{K_I} + 1 \right) \quad (Gl. 9)$$

K_M = wahre Michaelis-Konstante

$[I]$ = Inhibitorkonzentration

K_I = Inhibitionskonstante

Im betrachteten Fall ist nun die Inhibitorkonzentration $[I]$ der Konzentration $[S]_{en}$ des endogenen Substrats gleichzusetzen, und die Inhibitionskonstante K_I der Michaelis-Konstanten $K_{M,en}$ für den Abbau des endogenen Substrats. Diese Gleichsetzung ist möglich, da beide Konstanten, K_I und

$K_{M,en}$, für eine gegebene Konzentration an Inhibitor bzw. endogenem Substrat bestimmen, welcher Anteil des Enzyms an der Bindung des Inhibitors bzw. am Umsatz des endogenen Substrats beteiligt ist und daher nicht für andere enzymatische Reaktionen zur Verfügung steht. Die Gl. 9 wird dann zu :

$$K_{M,app} = K_M \cdot \left(\frac{[S]_{en}}{K_{M,en}} + 1 \right) \quad (Gl. 10)$$

Für den Fall der Konkurrenz exogenen Gangliosids G_{D1a} mit dem bereits in den mikrosomalen Membranen vorhandenen Gangliosid kann man annehmen, daß die Michaelis-Konstante für beide Substrate in etwa gleich ist, und Gl. 10 vereinfacht sich mit $K_{M,en} = K_M$ zu

$$K_{M,app} = K_M + [S]_{en} \quad (Gl. 11)$$

Der gemessene K_M -Wert liegt also um den Gangliosidgehalt der sialidasehaltigen Membranen über dem wahren K_M -Wert. Diese Differenz läßt sich in etwa abschätzen. Die verwendeten mikrosomalen Membranen enthielten je mg Protein ca. 15 nmol abbaubares Gangliosid, davon ca. 12 nmol Gangliosid G_{D1a} (vgl. Abschnitt 2.3.1.). Üblicherweise wurden für die enzymatischen Tests 100 µg mikrosomales Protein in 100 µl Volumen eingesetzt, was einer Konzentration an endogenen Gangliosidsubstraten von etwa 15 µM entspricht. Um diesen Betrag können die für den Gangliosidumsatz bestimmten K_M -Werte überschätzt sein, doch wurde eine Korrektur der Werte nicht vorgenommen, da der Fehler für alle gemessenen Michaelis-Konstanten ähnlich sein dürfte und diese ohnehin aufgrund anderer systematischer Mängel (vgl. vorhergehenden Abschnitt, sowie den Einfluß des Gangliosideinbaus, Abschnitt 4.1.) nicht das Prädikat "wahre" K_M beanspruchen können.

Für den Fall des Umsatzes zugesetzter wasserlöslicher Substrate durch die membrangebundene Sialidase läßt sich Gl. 10 nicht entsprechend vereinfachen, da sich K_M und $K_{M,en}$ jetzt deutlich unterscheiden dürften. Das gleiche gilt auch für die Verfälschung der gemessenen Michaelis-Konstanten durch die zweite Spezies endogener Substrate, die Sialoglykoproteine, deren Affinität zur membrangebundenen Sialidase gänzlich unbekannt ist.

6.4. Untersuchungen zum Einbau mizellaren Gangliosids in mikrosomale Membranen

6.4.1. Bestimmung der $[^3\text{H}]$ -Gangliosid-Zusammensetzung von Gangliosidmizellen und mikrosomalen Membranen nach erfolgter Sialidaseeinwirkung

Die mikrosomale Membranen und $[^3\text{H}]$ -Gangliosid G_{D1a} enthaltenden Ansätze wurden, wie in Abschnitt 6.3.1. beschrieben, bereitete und bei 37°C inkubiert. Nach der gewünschten Zeit wurden die Ansätze gut gemischt (Vortex-Genie-Mixer) und jeweils zwei Ansatzaliquots von $100 \mu\text{l}$ sofort auf Eis mit 0.25 M Tris-Lösung auf $\text{pH } 7.6$ bis 7.8 neutralisiert. Die dazu notwendigen Lösungsmengen waren zuvor für entsprechend simulierte Testansätze bestimmt worden. Eines der beiden Aliquots wurde in Gegenwart von 0.25% (w/v) Trypsin 30 min bei 37°C inkubiert. Nach 30-minütiger Zentrifugation der beiden Aliquots bei $82\,000 \text{ g}$ und 4°C (Rotor SW 25 von Beckmann, mit Adapter für Polyäthylen-Reaktionsgefäße) wurde der Überstand mit den freien Gangliosidmizellen abpipettiert und, wie in Abschnitt 6.3.3. beschrieben, mittels Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Sephrose sein Gehalt an $[^3\text{H}]$ -Gangliosid G_{D1a} und G_{M1} bestimmt. Das im Reaktionsgefäß verbliebene Pellet der mikrosomalen Membranen wurde durch kurzes Behandeln mit Ultraschall (Sonifier B-12 mit Cuphorn) in 0.2 ml Methanol resuspendiert und dann genauso auf seinen Gehalt an $[^3\text{H}]$ -Gangliosid G_{D1a} und G_{M1} untersucht. Der relative Anteil jeder der vier Fraktionen an der insgesamt wiedergefundenen Radioaktivität (in der Regel zwischen 80 und 90% der eingesetzten Radioaktivität) wurde durch Multiplikation mit der eingesetzten Gangliosidmenge in Substanzmengen umgerechnet.

6.4.2. Einbau des tritium- und spinmarkierten Gangliosid- G_{D1a} -Analogons $[^3\text{H}]$ -Doxyl- G_{D1a} in mikrosomale Membranen

Die mikrosomale Membranen und $[^3\text{H}]$ -Doxyl- G_{D1a} (zur Synthese s. Abschnitt 6.1.5.) enthaltenden Ansätze (genaue Zusammensetzung s. Abschnitt 2.3.5.2.) wurden auf Eis in Polyäthylen-Reaktionsgefäßen bereitete und gegebenenfalls bei 37°C inkubiert. Wie im vorhergehenden Abschnitt beschrieben, wurden Ansatzaliquots neutralisiert, gegebenenfalls mit Trypsin behandelt und durch Zentrifugation bei $100\,000 \text{ g}$ in ein mikrosomales Pellet und einen Überstand aufgetrennt. Die Suspension des Pellets in $40 \mu\text{l}$ 10 mM Tris/HCl-Puffer $\text{pH } 7.2$

wurde in eine Glaskapillare (ca. 0.1 ml Volumen) gefüllt und diese abgeschmolzen. Die mikrosomalen Membranen wurden durch halbstündige Zentrifugation bei 4 000 g an einem Ende der Kapillare konzentriert und dann der ESR-Messung zugeführt. Alle diese Handhabungen wurden soweit möglich in der Kälte durchgeführt, doch waren kurzzeitige Erwärmungen nicht immer zu vermeiden (z.B. beim Abschmelzen der Kapillare). Die ESR-Spektren wurden unter Anleitung von D. Marsh (Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen) an ei-

9 GHz-Spektrometer Varian E 12 aufgenommen, der mit einem System zur genauen Temperaturregelung ausgerüstet war. Die Probekapillare befand sich dabei in einem Standard-ESR-Quarzröhrchen ($\varnothing$ 4 mm), das zur Temperaturstabilisierung mit Silikonöl gefüllt war. Die Temperatur wurde innerhalb des Quarzröhrchens mit Hilfe eines Thermofühlers gemessen. Die ESR-Spektren wurden digitalisiert und mit Hilfe eines Computers ausgewertet. Zu anderen Details, insbesondere zur Spektrensubtraktion, s. bei D. Marsh (149, vgl. auch 227).

6.5. Partielle Reinigung der membrangebundenen Sialidase

6.5.1. Extraktion der Sialidase aus mikrosomalen Membranen

10 ml einer Suspension mikrosomaler Membranen aus Kalbshirn in 0.5 mM Tris/HCl-Puffer pH 7.2 (insgesamt 182 mg mikrosomales Protein) wurden mit 10 ml einer 4.5%-igen(w/v) wässrigen Lösung von Triton X-100 versetzt und in einem Teflon-Glas-Homogenisator bei 700 UpM homogenisiert (5 x Auf und Ab). Zur Entfernung unlöslicher Membranbestandteile wurde das Homogenat 30 min bei 41 000 g zentrifugiert (Rotor Ti-50, Beckmann) und der die solubilisierete Sialidase enthaltende Überstand (ca. 13 ml) abgenommen.

6.5.2. Differentielle Zentrifugation im Saccharosegradienten

In einem Zentrifugenröhrchen wurde durch jeweiliges Übersichten der folgende Saccharosegradient in einer wässrigen Lösung von 3 % (w/v) Triton X-100 und 0.02 % (w/v) Dithioerythrit aufgebaut:

- 5 ml 5 %-ige (w/v) Saccharose in genannter Lösung
- 10 ml 10 %-ige (w/v) Saccharose in genannter Lösung
- 10 ml 20 %-ige (w/v) Saccharose in genannter Lösung
- 10 ml 30 %-ige (w/v) Saccharose in genannter Lösung
- 10 ml 45 %-ige (w/v) Saccharose in genannter Lösung
- 5 ml 60 %-ige (w/v) Saccharose in genannter Lösung

Der Gradient wurde mit 11 ml der oben beschriebenen Sialidasesuspension überschichtet und 42 Stunden bei 77 000 g (Rotor SW-25.2, Beckmann) und 4° C zentrifugiert. Anschließend wurde der Gradient fraktioniert (1 ml-Fraktionen) und für jede Fraktion die Sialidaseaktivität gegenüber 4-MU-NeuAc (s. Abschnitt 6.3.1.) und refraktometrisch der Saccharosegehalt bestimmt. Die dem Aktivitätspeak entsprechenden Fraktionen zwischen 14 und 21 % Saccharose wurden vereinigt und einer isoelektrischen Fokussierung unterzogen.

6.5.3. Isoelektrische Fokussierung

Nebenstehend ist schematisch der Aufbau der Lösungen in einer kleinen Elektrofokussiersäule nach Harzer (75) gezeigt. Die wässrigen Lösungen A (Anodenlösung) und F (Kathodenlösung) enthielten neben 0.1 % (w/v) Triton X-100 und 0.02% (w/v) Dithioerythrit außerdem 0.1% (v/v) konz. Schwefelsäure bzw. 1.5 % (v/v) Ethylen-diamin und 50 % (w/v) Saccharose. Die anderen wässrigen Lösungen hatten die folgende Zusammensetzung:

Lösung B:

0.1 % (w/v) Triton X-100

0.1 M Mercaptoethanol

2 % (w/v) Saccharose

Lösung C:

1.5 ml Sialidasesuspension

0.8 ml Ampholine (pH 2.5 - 5 und 5 - 8)

4.5 ml einer wässrigen Lösung von

1 % (w/v) Glycin, 0.1 % (w/v) Triton

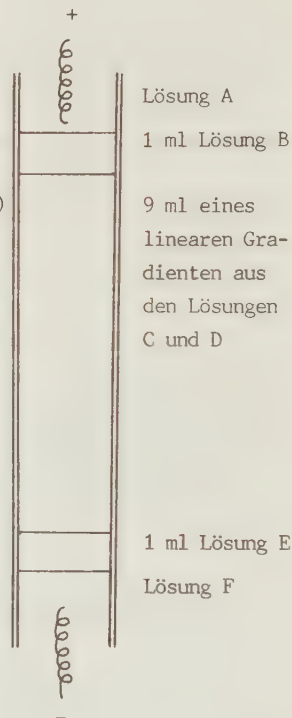
X-100 und 0.02 % (w/v) Dithioerythrit

Lösung D:

1.5 ml Sialidasesuspension

0.8 ml Ampholine

4.5 ml einer wässrigen Lösung von 0.1 % (w/v) Triton X-100, 0.02 % (w/v) Dithioerythrit und 35 % (w/v) Saccharose



Lösung E:

Wie Lösung D, aber ohne Sialidasesuspension.

Nach 18 Stunden Laufzeit bei ca. 15° C, einer Spannung von 1000 V und einer Stromstärke von ca. 1 mA wurde der Säulinhalt fraktioniert (Fraktionen zu 0.6 ml) und die Fraktionen auf Sialidaseaktivität gegenüber 4-MU-NeuAc und Gangliosid G_{D1a} getestet (s. Abschnitt 6.3.1. und 6.3.3.). Die pH-Werte in den Fraktionen wurden an einem pH-Meter mit Mikro-Saugelektrode gemessen.

6.6. Bestimmung der Fluidität mikrosomaler Membranen durch Messung der Fluoreszenzdepolarisation

6.6.1. Theorie und Auswertung der Fluoreszenzdepolarisationsmessung

Basierend auf den Arbeiten von Perrin (182) und Weber (280, 281) wurde die Messung der Gleichgewichtsfluoreszenzdepolarisation erstmals vor gut zehn Jahren von Shinitzky und Mitarbeitern (235, 32, 236) zur Bestimmung der Viskosität von Membransystemen verwendet (Ü 238). Dabei wird eine fluoreszierende Probesubstanz mit definierten spektralen Eigenschaften in die zu untersuchenden Lipidphasen (z.B. Liposomen, Membranen, etc.) eingelagert und mit monochromatischem, polarisiertem Licht zur Fluoreszenz angeregt. Das Fluoreszenzlicht wird durch zwei Polarisatoren betrachtet, von denen der eine parallel und der andere senkrecht zur Polarisationsrichtung des anregenden Lichtes steht. Der Grad der Fluoreszenzdepolarisation P, die Fluoreszenzanisotropie r und die Fluoreszenzintensität F sind dann folgendermaßen definiert:

$$P = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}} = \frac{\frac{I_{\parallel}}{I_{\perp}} - 1}{\frac{I_{\parallel}}{I_{\perp}} + 1} = \frac{3r}{2 + r} \quad (\text{Gl. 12})$$

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} = \frac{\frac{I_{\parallel}}{I_{\perp}} - 1}{\frac{I_{\parallel}}{I_{\perp}} + 2} = \frac{2P}{3 - P} \quad (\text{Gl. 13})$$

$$F = I_{\parallel} + 2 I_{\perp} \quad (\text{Gl. 14})$$

$I_{\parallel}$, $I_{\perp}$ = Intensität des Fluoreszenzlichts, mit Polarisationsrichtung parallel bzw. senkrecht zu der des anregenden Lichts

Je kleiner die Viskosität bzw. je größer die Fluidität ist, desto ungehinderter kann sich das fluoreszierende Molekül drehen und desto größer wird $I_{\perp}$. Bei völlig freier Rotation und genügend großer Lebensdauer des angeregten Zustands wird $I_{\parallel} = I_{\perp}$, und P und r gehen gegen Null. Bei völlig verhinderter Rotation, wie etwa in einer festen Lösung, ergeben sich als obere theoretische Grenzen: $I_{\parallel}/I_{\perp} = 3$, $P = 0.5$, $r = 0.4$. Das Verhalten zwischen diesen Grenzen hängt von den spektralen und hydrodynamischen Eigenschaften des untersuchten Systems ab.

Ursprünglich wurden die so erhaltenen Meßwerte anhand der Perringleichung

$$\frac{r_o}{r} = 1 + \frac{\tau}{\rho} \quad (\text{Gl. 15})$$

und der Beziehung
$$\rho = \frac{\eta \cdot V}{k T} \quad (\text{Gl. 16})$$

in "Mikroviskositäten" $\bar{\eta}$ umgerechnet:

$$\frac{r_o}{r} = \frac{\frac{1}{P} - \frac{1}{3}}{\frac{1}{P_o} - \frac{1}{3}} = 1 + C(r) \frac{T \tau}{\bar{\eta}} \quad (\text{Gl. 17})$$

τ = mittlere Lebensdauer des angeregten Zustands

ρ = Rotationsrelaxationszeit

η = Viskosität

V = wirksames molares Volumen des fluoreszierenden Sondenmoleküls

k = Boltzmannkonstante

T = absolute Temperatur

$\bar{\eta}$ = mittlere Viskosität in der Umgebung des Sondenmoleküls ("Mikroviskosität")

$C(r)$ ist ein Korrelationsfaktor, der von strukturellen Eigenschaften des Sondenmoleküls und auch von r selbst abhängt. Er muß empirisch anhand einer

dem zu untersuchenden System möglichst ähnlichen Referenzflüssigkeit mit makroskopisch leicht meßbarer Viskosität η bestimmt werden, indem man eine Korrelation zwischen $\frac{r}{r_0}$ und $\frac{T}{\eta} \tau$ erstellt. Eine solche Übertragung makroskopischer, in isotropen Referenzflüssigkeiten erhaltener Parameter auf die dynamischen Verhältnisse im Innern anisotroper Lipidmembranen ist jedoch recht problematisch, wie mehrfach kritisiert wurde (109, 29, 39, 118, 119).

In jüngerer Zeit haben aber theoretische Überlegungen zusammen mit zeit-aufgelösten Messungen der Fluoreszenzdepolarisation im Nanosekundenbereich zu weiteren Erkenntnissen geführt. Im einfachsten Fall folgt nach Einstrahlen eines kurzen Lichtblitzes das zeitliche Abklingen sowohl der Fluoreszenzintensität $I(t)$ als auch der Fluoreszenzanisotropie $r(t)$ einem einfachen Exponentialgesetz (109). Dabei fällt $r(t)$ von einem Wert r_0 zur Zeit $t = 0$, d.h. zum Zeitpunkt der Lichteinstrahlung, ab auf einen Grenzwert r_∞ , der im Fall von Lipidmembranen in der Regel größer als Null ist. Eine Integration über die Zeit liefert für die Gleichgewichtsfluoreszenzanisotropie r (99, 83):

$$r = \frac{r_0 - r_\infty}{1 + \frac{\tau}{\eta}} + r_\infty \quad (\text{Gl. 18})$$

Ein Vergleich mit Gl. 15 zeigt, daß nur im Fall $r_\infty = 0$ die in Gl. 17 aufgestellte Beziehung zwischen r und $\bar{\eta}$ Gültigkeit hat. Für $r_\infty \neq 0$ muß r_∞ bestimmt werden, um über Gl. 18 η und damit $\bar{\eta}$ ermitteln zu können. Darüber hinaus bietet aber die Kenntnis von r_∞ einen weiteren Vorteil. Sie gestattet es, ähnlich wie bei Elektronenspinresonanz- und Kernresonanzmessungen, Ordnungsparameter S auszurechnen (99, 83):

$$S^2 = \frac{r_\infty}{r_0} \quad (\text{Gl. 19})$$

Van Blitterswijk und Mitarbeiter (265, vgl. auch 184) haben nun ein empirisches Verfahren entwickelt, das auch für reale Membransysteme mit $r_\infty \neq 0$ ohne die apparativ wesentlich aufwendigeren, zeitaufgelösten Messungen eine Auswertung der Gleichgewichtsfluoreszenzanisotropie r zuläßt. Sie konnten zeigen, daß für eine Vielzahl biologischer und künstlicher Membranen ein enger Zusammenhang zwischen r_∞ und r besteht. Im Bereich $0.13 < r < 0.28$ folgt er der einfachen, empirisch ermittelten Beziehung

$$r_{\infty} = \frac{4}{3} r - 0.10 \quad (\text{Gl. 20})$$

Damit lassen sich allein aus nicht zeitaufgelösten Messungen von r in guter Näherung Werte für die Mikroviskosität η (über die Gl. 18 und 16) und den Ordnungsparameter S (über Gl. 19) biologischer Membranen erhalten. Nach Van Blitterswijk (265) ist der Ordnungsparameter gegenüber der Mikroviskosität als Maß für die Membranfluidität vorzuziehen, die am besten durch den Kehrwert $\frac{1}{S}$ des Ordnungsparameters repräsentiert wird. Nach Einsetzen von Gl. 20 in Gl. 19 bekommt man:

$$\frac{1}{S} = \sqrt{\frac{r_0}{\frac{4}{3} r - 0.10}} \quad (\text{Gl. 21})$$

Diese Gleichung ordnet nun jedem Meßwert für die Fluoreszenzanisotropie r bzw. für die Fluoreszenzpolarisation P , die ja nach den Gl. 12 und 13 leicht ineinander umrechenbar sind, einen Näherungswert $\frac{1}{S}$ für die Membranfluidität zu.

Als fluoreszierendes Sondenmolekül wurde für die durchgeführten Fluoreszenzdepolarisationsmessungen die Verbindung 1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatrien (DPH) ausgewählt, da sie dafür aufgrund ihrer physikalisch-chemischen Eigenschaften ganz besonders geeignet ist (236, 134, 29, Ü 238). Die selbst völlig hydrophoben DPH-Moleküle lagern sich in das hydrophobe Membraninnere ein, ohne bestimmte Lipidphasen zu bevorzugen (135, 142). Die hohe Fluoreszenzausbeute erlaubt es, nur sehr wenig DPH einzusetzen, so daß die Membran durch die Sonde kaum gestört wird (z.B. Ü 101, 130). Die DPH-Moleküle orientieren sich in der Membran parallel zu den Fettsäureketten der Lipide (4) und führen um diese Gleichgewichtslage je nach Membranfluidität mehr oder weniger ausgeprägte, kegelförmige Rotationsbewegungen aus (110, 29), die dann in der beobachteten Fluoreszenzdepolarisation zum Ausdruck kommen. Unter den eingehaltenen Meßbedingungen (Anregungswellenlänge 365 nm) beträgt der Grenzwert für die Polarisation, P_0 , statt des theoretischen Werts von 0.5 (s. oben) nur 0.46 (236, 134, Ü 238), bzw. für die Anisotropie r_0 0.362 anstatt 0.4.

Drückt man nun mit Hilfe der Gl. 21 und 13 die Membranfluidität als Funktion der Fluoreszenzpolarisation P aus (die verwendete Meßanordnung lieferte direkt Werte für P , s. folgenden Abschnitt) und setzt diesen Grenzwert $P_0 = 0.46$ in die Rechnung ein, so läßt sich für jeden Wert des Ausdrucks

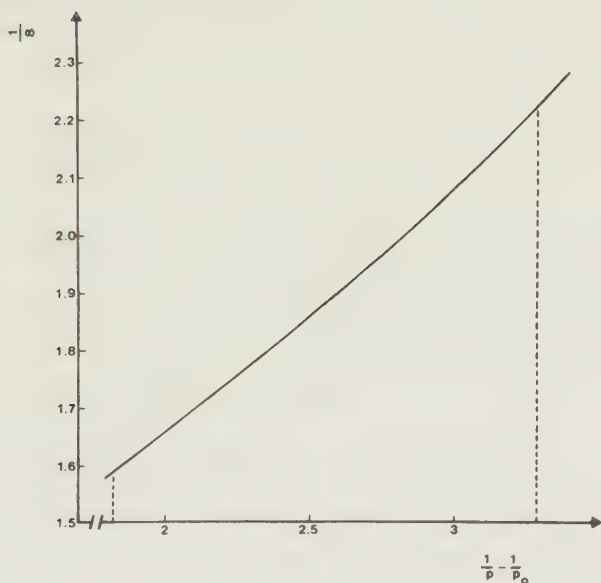


Abb. 46

Korrelation zwischen dem Kehrwert des Ordnungsparameters S und dem Ausdruck $\frac{1}{P} - \frac{1}{P_0}$

Die Berechnung der Kurve erfolgte anhand der Gl. 21 und 13, wobei für P_0 der Wert 0.46 verwendet wurde, entsprechend $r_0 = 0.362$. Die obere gestrichelte Linie markiert den Gültigkeitsbereich von Gl. 20 ($0.13 < r < 0.28$ bzw. $0.18 < P < 0.37$ bzw. $0.54 < \frac{1}{P} - \frac{1}{P_0} < 3.29$), die untere den kleinsten experimentell gemessenen Wert für $\frac{1}{P} - \frac{1}{P_0}$ (vgl. Abschnitt 4.4.1.)

$\frac{1}{P} - \frac{1}{P_0}$ (der sich aus den Meßwerten für P leicht bilden läßt) die zugehörige Membranfluidität $\frac{1}{S}$ berechnen. Eine theoretische Korrelation zwischen diesen beiden Größen für den Gültigkeitsbereich von Gl. 20 zeigt, daß die Fluidität $\frac{1}{S}$ in guter Näherung linear mit $\frac{1}{P} - \frac{1}{P_0}$ zunimmt (Abb. 46).

Interessanterweise führt auch die von Van Blitterswijk und Mitarbeitern abgelehnte Umrechnung in Mikroviskositäten $\bar{\eta}$ letztendlich zu einem sehr

ähnlichen Ergebnis. Nach Shinitzky und Barenholz (238) läßt sich der Ausdruck $C(r) \cdot T \cdot \tau$ in Gl. 17 für viele Membransysteme in guter Näherung durch den konstanten Wert 2.4 Poise ersetzen. Eine einfache Umformung ergibt dann für die Membranfluidität $\frac{1}{\bar{\eta}}$ [Poise⁻¹]:

$$\frac{1}{\bar{\eta}} = \frac{\frac{1}{\bar{P}} - \frac{1}{\bar{P}_0}}{2.4 \left(\frac{1}{\bar{P}_0} - \frac{1}{3} \right)} = \frac{\frac{1}{\bar{P}} - \frac{1}{0.46}}{\frac{2.4}{0.46} - 0.8} = 0.226 \left(\frac{1}{\bar{P}} - \frac{1}{0.46} \right) \quad (\text{Gl. 22})$$

also ebenfalls eine direkte Proportionalität zwischen der Membranfluidität, diesmal repräsentiert durch $\frac{1}{\bar{\eta}}$, und der Größe $\frac{1}{\bar{P}} - \frac{1}{\bar{P}_0}$.

Obwohl $\frac{1}{\bar{S}}$ und $\frac{1}{\bar{\eta}}$ nicht den gleichen physikalischen Hintergrund haben ($\bar{\eta}$ bezieht sich auf den Reibungswiderstand, den das rotierende Sondenmolekül erfährt, $\bar{S}$ dagegen auf die Beschränkung seiner Bewegungsmöglichkeiten), hängen damit beide Größen im betrachteten Meßbereich näherungsweise linear von $\frac{1}{\bar{P}} - \frac{1}{\bar{P}_0}$ ab. Bei der Bestimmung der Fluidität mikrosomaler Membranen wurde daher auf eine Umrechnung der erhaltenen Meßwerte für die Fluoreszenzpolarisation $\bar{P}$ in die Kehrwerte des Ordnungsparameters oder der Mikroviskosität verzichtet und einfach die Größe $\frac{1}{\bar{P}} - \frac{1}{\bar{P}_0} = \frac{1}{\bar{P}} - \frac{1}{0.46}$ als Maß für die Membranfluidität verwendet.

6.6.2. Experimentelle Durchführung der Fluoreszenzdepolarisationsmessung

a) wässrige Suspension von DPH (236, 237)

4 ml 10 mM Tris/HCl-Puffer pH 7.2 wurden auf ca. 45° C erwärmt. Unter heftigem Rühren wurden aus einer Mikroliterspritze 5 µl einer 2 mM DPH-Lösung in Tetrahydrofuran zugegeben. Reste von Tetrahydrofuran wurden durch Spülen mit Stickstoff entfernt. Diese Suspension von 2.5 µM DPH in 10 mM Tris/HCl-Puffer pH 7.2 war bei 4° C einige Tage haltbar.

b) Meßansatz

80 µl Wasser bzw. wässrige Alkohollösung wurde mit 80 µl einer 2.5 mM DPH-Suspension in 10 mM Tris/HCl-Puffer pH 7.2 und 40 µl einer Mikrosomensuspension der Proteinkonzentration 5 $\frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ im gleichen Puffer versetzt. Nach gründlichem Mischen (Vortex-Genie-Mixer) wurde der Ansatz ca. 10 min bei 37° C inkubiert (Einbau des DPH in die mikrosomalen Membranen) und in eine kleine Durchflußküvette mit drei lichtdurchlässigen Seiten gefüllt.

c) Messung der Fluoreszenzdepolarisation

Die Fluoreszenzküvette mit dem Meßansatz wurde in einem Microviscosimeter MV-1a auf 37° C thermostatisiert. Die Fluoreszenzprobe DPH in den mikrosomalen Membranen wurde mit linear polarisiertem Licht der Wellenlänge 365 nm zur Aussendung von Fluoreszenzlicht angeregt, dessen Intensität bei Wellenlängen über 410 nm nach getrenntem Durchgang durch zwei Polarisationsfilter mittels zweier Photomultiplier gemessen wurde. Eines dieser Filter war parallel (I_{II}), das andere senkrecht (I_I) zur Polarisationssebene des Anregungslichts orientiert, so daß das Gerät aus den beiden Intensitäten direkt gemäß Gl. 12 des vorhergehenden Abschnitts die Fluoreszenzpolarisation P berechnen und anzeigen konnte (bezüglich einer detaillierten Beschreibung der Meßanordnung und des Geräts s. 214).

6.6.3. Ergebnisse einiger Kontrollmessungen

Im Rahmen der Diplomarbeit (214) waren umfangreiche Kontrollversuche zur Messung der Fluoreszenzdepolarisation in mikrosomalen Membranen durchgeführt worden, deren wichtigste Ergebnisse hier kurz zusammengefaßt sind:

- 1) Eine Bestimmung der Fluoreszenzpolarisation unter den Bedingungen des Sialidasetests, d.h. bei sauren pH-Werten, war nicht möglich, da die mikrosomalen Membranen unterhalb von pH 5 aggregierten und sich absetzten. Dies führte zu einem drastischen Verlust an Fluoreszenzintensität, der keine verlässliche Messung von P zuließ.
- 2) Der Einbau von DPH in die mikrosomalen Membranen war bei der im vorhergehenden Abschnitt beschriebenen Versuchsführung bis Meßbeginn größtenteils erfolgt.
- 3) Eine Verdopplung der DPH-Menge pro Ansatz veränderte den Wert von P nicht.
- 4) Die Fluoreszenz der wässrigen DPH-Suspension betrug weniger als 3 % derjenigen markierter Membranpräparationen, auch in Gegenwart der höchsten Alkoholkonzentrationen. Das gleiche gilt für die Intensität des Streulichts unmarkierter mikrosomaler Membranen. Außerdem wurde am Gerät noch eine Streulichtkorrektur durchgeführt.
- 5) Ein Zusatz solcher Mengen an Gangliosid G_{D1a} , wie bei den enzymatischen Tests üblich war, konnte die Fluoreszenzpolarisation nicht signifikant beeinflussen.

7. Literaturverzeichnis

1. Acevedo E. "Überprüfung einer modifizierten Michaelis-Menten-Kinetik für den enzymatischen Umsatz von Lipiden in Membranphasen. Hydrolyse des Gangliosids G_{D1a} durch die membranständige Neuramidase", Diplomarbeit, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn (1981)
Biochim. Biophys. Acta 424, 98-105 (1976)
2. Ando S., Isobe M., Nagai Y. Anal. Biochem. 89, 437-450 (1978)
3. Ando S., Chang N.-C., Yu R.K. Biochemistry 15, 1257-1261 (1976)
4. Andrich M.P., Vanderkooi J.M. Biophys. J. 16, 1055-1069 (1976)
5. Axelrod D., Koppel D.E., Schlessinger J., Elson E., Webb W.W. Biochemistry 17, 3604-3609 (1978)
6. Axelrod D., Wight A., Webb W., Horwitz A. Adv. Exp. Med. Biol. 125, 105-123 (1980)
7. Barenholz Y., Cestaro B., Lichtenberg D., Freire E., Thompson T.E., Gatt S. ibid. S. 213-226
8. Basu S., Basu M., Chien J.-L., Presper K. Biochim. Biophys. Acta 706, 212-220 (1982)
9. Beauregard G., Melançon S.B., Dallaire L., Potier M. FEBS Lett. 31, 297-300 (1973)
10. Behr J.-P., Lehn J.-M. Biochim. Biophys. Acta 647, 196-202 (1981)
11. Bertoli E., Masserini M., Sonnino S., Ghidoni R., Cestaro B., Tettamanti G. Nature 252, 478-480 (1974)
12. Besançon F., Ankel H. Anal. Biochem. 69, 385-394 (1975)
13. Bhavanandan V.P., Yeh A.K., Carubelli R. "Theorie und Methoden der Enzymkinetik", Verlag Chemie, Weinheim, S. 55-102 (1979)
14. Bisswanger H. J. Biol. Chem. 256, 5988-5991 (1981)
15. Bloj B., Zilversmit D.B. Can. J. Biochem. 58, 755-770 (1980)
16. Boggs J.M. Biochim. Biophys. Acta 266, 695-707 (1972)
17. Breckenridge W.C., Gombos G., Morgan I.G. Biochem. J. 19, 338-339 (1925)
18. Briggs G.E., Haldane J.B.S. Lipids 17, 1001-1003 (1982)
19. Brockerhoff H. Anesthesiology 57, 399-403 (1982)
20. Bull M.H., Brailsford J.D., Bull B.S. Eur. J. Biochem. 80, 425-432 (1977)
21. Callies R., Schwarzmann G., Radsak K., Siegert R., Wiegandt H. Biochim. Biophys. Acta 60, 196-197 (1962)
22. Carubelli R., Trucco R.E., Caputto R. Biochim. Biophys. Acta 237, 78-87 (1971)
23. Carubelli R., Tulsiani D.R.P. Methods Enzymol. 8, 680-685 (1966)
24. Cassidy J.T., Jourdan G.W., Roseman S. Ital. J. Biochem. 28, 116-118 (1979)
25. Cestaro B. Bull. Mol. Biol. Med. 4, 240-249 (1979)
26. Cestaro B., Ippolito G., Ghidoni R., Orlando P., Tettamanti G. Biochemistry 19, 615-619 (1980)
27. Cestaro B., Barenholz Y., Gatt S. Q. Rev. Biophys. 8, 185-235 (1975)
28. Chapman D.

29. Chen L.A., Dale R.E., Roth S., Brand L. J. Biol. Chem. 252, 2163-2169 (1977)
30. Chigorno V., Sonnino S., Ghidoni R., Tettamanti G. Neurochem. Int. 4, 397-403 (1982)
31. Clancy R.M., Wissenberg A.R., Glaser M. Biochemistry 20, 6060-6065 (1981)
32. Cogan U., Shinitzky M., Weber G., Nishida T. Biochemistry 12, 521-528 (1973)
33. Coleman R. Biochim. Biophys. Acta 300, 1-30 (1973)
34. Conzelmann E., Burg J., Stephan G., Sandhoff K. Eur. J. Biochem. 123, 455-464 (1982)
35. Corfield A.P., Michalski J.-C., Schauer R. "Sialidases and Sialidoses", Perspectives in Inherited Metabolic Diseases, Vol. 4, Hrsg. Tettamanti G., Durand P., DiDonato S., Edi Ermes, Mailand, S. 3-70 (1981)
36. Corti M., Degiorgio V., Ghidoni R., Sonnino S., Tettamanti G. Chem. Phys. Lipids 26, 225-238 (1980)
37. Cuatrecasas P. Methods Enzymol. 28, 897-902 (1972)
38. Cullis P.R. FEBS Lett. 70, 223-228 (1976)
39. Dale R.E., Chen L.A., Brand L. J. Biol. Chem. 252, 7500-7510 (1977)
40. D'Ans-Lax Taschenbuch für Chemiker und Physiker, Bd. I, 3. Aufl., Springer Verlag, Berlin, S. 1442-1446 (1967)
41. Dawson G. "The Glycoconjugates", Vol. II, Hrsg. Horowitz M.I., Pigman W., Academic Press New York, S. 255-284 (1978)
42. Dawson G. ibid. S. 285-336
43. De Laat S.W., Van der Saag P.T., Elson E.L., Schlessinger J. Biochim. Biophys. Acta 558, 247-250 (1979)
44. Delmelle M., Dufrane S.P., Brasseur R., Ruyschaert J.M. FEBS Lett. 121, 11-14 (1980)
45. Den H., Kaufman B., McGuire E.J., Roseman S. J. Biol. Chem. 250, 739-746 (1975)
46. Dimpfel W. Cell. Mol. Neurobiol. 2, 105-113 (1982)
47. Dixon M. Biochem. J. 55, 170-171 (1953)
48. Dixon M., Webb E.C. "The Enzymes", 3. Aufl., Longman Group Ltd. London, S. 72 (1979)
49. Dixon M., Webb E.C. ibid. S. 334-335
50. Dixon M., Webb E.C. ibid. S. 167-169 und 465
51. Dunn A.J., Hogan E.L. Pharmacol. Biochem. Behav. 3, 605-612 (1975)
52. Eibl H., Blume A. Biochim. Biophys. Acta 553, 476-488 (1979)
53. Eldridge C.A., Elson E.L., Webb W.W. Biochemistry 19, 2075-2079 (1980)
54. Fahey P.F., Webb W.W. Biochemistry 17, 3046-3053 (1978)
55. Felgner P.L., Freire E., Barenholz V., Thompson T.E. Biochemistry 20, 2168-2172 (1981)

56. Fishman P.H., Brady R.O. *Science* 194, 906-915 (1976)
57. Formisano S., Johnson M.L., Lee G., Aloj S.M., Edelhoch H. *Biochemistry* 18, 1119-1124 (1979)
58. Fourcans B., Jain M.K. *Adv. Lipid Res.* 12, 147-226 (1974)
59. Freedman R.B. "Membrane Structure", Hrsg. Finean J.B., Mitchell R.H., Elsevier/North-Holland, Biomedical Press Amsterdam, S. 161-214 (1981)
60. Galla H.-J., Luisetti J. *Biochim. Biophys. Acta* 596, 108-117 (1980)
61. Galla H.-J., Trudell J.R. *Mol. Pharmacol.* 19, 432-437 (1981)
62. Gammack D.B. *Biochem. J.* 88, 373-383 (1963)
63. Gatt S. *Chem. Phys. Lipids* 5, 235-249 (1970)
64. Gatt S., Bartfai I. *Biochim. Biophys. Acta* 488, 1-24 (1977)
65. Ghidoni R., Sonnino S., Tettamanti G. *Lipids* 17, 820-822 (1978)
66. Gielen W., Harpprecht V. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 350, 201-206 (1969)
67. Glick M.C., Flowers H. "The Glycoconjugates", Vol. II, Hrsg. Horowitz M.I., Pigman W., Academic Press New York, S. 337-384 (1978)
68. Hackenbrock C.R. *Trends Biochem. Sci.* 6, 151-154 (1981)
69. Hakomori S.-I. *Biochim. Biophys. Acta* 417, 55-89 (1975)
70. Hammond K.S., Papermaster D.S. *Anal. Biochem.* 74, 292-297 (1976)
71. Hanski E., Rimon G., Levitzky A. *Biochemistry* 18, 846-853 (1979)
72. Hansson H.-A., Holmgren J., Svennerholm L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 3782-3786 (1977)
73. Hardt S.L. *Biophys. Chem.* 10, 239-243 (1979)
74. Harris P.L., Thornton E.R. *J. Am. Chem. Soc.* 100, 6738-6745 (1978)
75. Harzer K. *Z. Anal. Chem.* 252, 170-174 (1970)
76. Hauser H., Levine B.A., Williams R.J.P. *Trends Biochem. Sci.* 1, 278-281 (1976)
77. Hauser H., Guyer W., Howell K. *Biochemistry* 18, 3285-3291 (1979)
78. Haverkamp J., Veh R.W., Sander M., Schauer R., Kamberling J.P., Vliegenthart J.G.F. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 358, 1609-1612 (1977)
79. Heijlman J., Roukema P.A. *J. Neurochem.* 19, 2567-2575 (1972)
80. Helenius A., Simons K. *Biochim. Biophys. Acta* 415, 29-79 (1975)
81. Helenius A., McCaslin D.R., Fries E., Tanford C. *Methods Enzymol.* 56, 734-749 (1979)
82. Helting I.B., Zwisler O., Wiegandt H. *J. Biol. Chem.* 252, 194-198 (1977)
83. Heyn M.P. *FEBS Lett.* 108, 359-364 (1979)
84. Hill M.W., Lester R. *Biochim. Biophys. Acta* 282, 18-30 (1972)

85. Hill M.W. Biochim. Biophys. Acta 356, 117-124 (1974)
86. Hill M.W. Biochem. Soc. Trans. 3, 149-152 (1975)
87. Hoffmann-Bleihauer P. "Synthese von markierten Sphingomyelinen zur Durchführung von Einbau-, Fluiditäts- und Abbaustudien in Membranen", Diplomarbeit, Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn (1981)
88. Holmgren J., Lönnroth I., Svennerholm L. Infect. Immun. 8, 208-214 (1973)
89. Holmgren J., Elwing H., Fredman P., Strannegard Ö., Svennerholm L. Adv. Exp. Med. Biol. 125, 453-470 (1980)
90. Horvat A., Touster O. J. Biol. Chem. 243, 4380-4390 (1968)
91. Howard R.E., Burton R.M. Biochim. Biophys. Acta 84, 435-440 (1964)
92. Irwin L.N., Samson F.E. J. Neurochem. 18, 203-211 (1971)
93. Israelachvili J.N. Biochim. Biophys. Acta 469, 221-225 (1977)
94. Israelachvili J.N., Mitchell D.J., Ninham B.W. Biochim. Biophys. Acta 470, 185-201 (1977)
95. Ito T., Ohnishi S.-I. Biochim. Biophys. Acta 352, 29-37 (1974)
96. IUPAC-IUB Commission Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 358, 617-631 (1977)
97. Iwamori M., Nagai Y. Biochim. Biophys. Acta 528, 257-267 (1978)
98. Jacobson K., Papahadjopoulos D. Biochemistry 14, 152-161 (1975)
99. Jähnig F. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 6361-6365 (1979)
100. Jähnig F. Biophys. J. 36, 347-357 (1981)
101. Jain M.K., Wu N.M. J. Membr. Biol. 34, 157-201 (1977)
102. Jain M.K., White H.B. Adv. Lipid. Res. 15, 1-60 (1977)
103. Jain M.K., Gleeson J., Upreti A., Upreti G.C. Biochim. Biophys. Acta 509, 1-8 (1978)
104. Jones D.H., Matus A.I. Biochim. Biophys. Acta 356, 276-287 (1974)
105. Joseph K.C., Stieber A., Gonatas N.K. J. Cell Biol. 81, 543-554 (1979)
106. Kamaya H., Ueda I., Moore P.S., Eyring H. Biochim. Biophys. Acta 550, 131-137 (1979)
107. Kaneshina S., Kamaya H., Ueda I. J. Colloid Interface Sci. 83, 589-598 (1981)
108. Karlson P. Biochemie, 11. Aufl., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, S. 272 (1980)
109. Kinoshita K., Kawato S., Ikegami A. Biophys. J. 20 289-305 (1977)
110. Kinoshita K., Kawato S., Ikegami A., Yoshida S., Orii Y. Biochim. Biophys. Acta 647, 7-17 (1981)
111. Kishore G.S., Tulsiani D.R.P., Bhavanandan V.P., Carubelli R. J. Biol. Chem. 250, 2655-2659 (1975)
112. Klausner R.D., Kleinfeld A.M., Hoover R.L., Karnovsky M.J. J. Biol. Chem. 255, 1286-1295 (1980)
113. Klemm W.R., Engen R.L. J. Neurosci. Res. 4, 371-382 (1979)
114. Koppel D.E. Biophys. J. 28, 281-292 (1979)
115. Kutchai H., Cooper R.A., Forster R.E. Biochim. Biophys. Acta 600, 542-552 (1980)
116. Kutchai H., Chandler L.H., Geddis L.M. Biochim. Biophys. Acta 600, 870-881 (1980)

117. Kuwata T., Handa S., Fuse A., Morinaga N. Biochem. Biophys. Res. Commun. 85, 77-84 (1978)
118. Lakowicz J.R., Prendergast F.G. Science 200, 1399-1401 (1978)
119. Lakowicz J.R., Prendergast F.G., Hogen, D. Biochemistry 18, 508-519 (1979)
120. Landa C.A., Defilpo S.S., Maccioni H.J.F., Caputto R. J. Neurochem. 37, 813-823 (1981)
121. Lapetina E.G., Soto E.F., De Robertis E. Biochim. Biophys. Acta 135, 33-43 (1967)
122. Ledeen R.W., Yu R.K. "Biological Roles of Sialic Acid", Hrsg. Rosenberg A., Schengrund C.-L., Plenum Press New York and London, S. 1-57 (1976)
123. Ledeen R.W. J. Supramol. Struct. 8, 1-17 (1978)
124. Ledeen R.W., Skrivaneck J.A., Nuffez J., Sciafani J.R., Norton W.T., Farooq M. "Gangliosides in Neurological and Neuromuscular Function, Development and Repair", Hrsg. Rapport M.M., Gorio A., Raven Press, New York, S. 211-223 (1981)
125. Lee A.G. Biochemistry 15, 2448-2454 (1976)
126. Lee A.G. Biochim. Biophys. Acta 472, 237-281 (1977)
127. Lee G., Aloj S.M., Kohn L.D. Biochem. Biophys. Res. Commun. 77, 434-441 (1977)
128. Lee P.M., Grant C.W.M. Biochem. Biophys. Res. Commun. 95, 1299-1305 (1980)
129. Leibovitz Z., Gatt S. Biochim. Biophys. Acta 152, 136-143 (1968)
130. Lelkes P.I., Kapitkovsky A., Eibl H., Miller I.R. FEBS Lett. 103, 181-185 (1979)
131. Lenaz G., Bertoli E., Curatola G., Mazzanti L., Bigi A. Arch. Biochem. Biophys. 172, 278-288 (1976)
132. Lenaz G., Curatola G., Mazzanti L., Parenti-Castelli G., Bertoli E. Biochem. Pharmacol. 27, 2835-2844 (1978)
133. Lenaz G., Curatola G., Mazzanti L., Bertoli E., Pastuszko A. Ital. J. Biochem. 27, 267-268 (1978)
134. Lentz B.R., Barenholz Y., Thompson T.E. Biochemistry 15, 4521-4528 (1976)
135. Lentz B.R., Barenholz Y., Thompson T.E. ibid. S. 4529-4537
136. Leskawa K.C., Rosenberg A. Adv. Exp. Med. Biol. 125, 125-135 (1980)
137. Levine Y.K., Birdsall N.J.M., Lee A.G., Metcalfe J.C. Biochemistry 11, 1416-1421 (1972)
138. Li Y., Leonard K., Weiss H. Eur. J. Biochem. 116, 199-205 (1981)
139. Liebman P.A., Pugh E.N. Vision Res. 19, 375-380 (1979)
140. Linden C.D., Wright K.L., McConnell H.M., Fox C.F. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 2271-2275 (1973)
141. Lineweaver H., Burk D. J. Am. Chem. Soc. 56, 658-666 (1934)

142. London E., Feigenson G.W. Biochim. Biophys. Acta 649, 89-97 (1981)
143. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. J. Biol. Chem. 193, 265-275 (1951)
144. Macdonald A.G. Biochim. Biophys. Acta 507, 26-37 (1978)
145. Macnaughtan W., Macdonald A.G. Biochim. Biophys. Acta 597, 193-198 (1980)
146. Maggio B., Cumar F.A., Caputto R. FEBS Lett. 90, 149-152 (1978)
147. Maggio B., Cumar F.A., Caputto R. Biochem. J. 189, 435-440 (1980)
148. Mandel P., Dreyfus H., Yusufi A.N.K., Sarliève L., Robert J., Neskovic N., Harth S., Rebel G. Adv. Exp. Med. Biol. 125, 515-531 (1980)
149. Marsh D. "Techniques in Lipid and Membrane Biochemistry", Vol. B 4/II, Hrsg. Metcalfe J.C., Hesketh T.R., Elsevier, Ireland, S. B 426/1-B 426/44 (1982)
150. Marsh D., Pellkofer R., Hoffmann-Bleihauer P., Sandhoff K. Anal. Biochem. 122, 206-212 (1982)
151. Martin F.J., MacDonald R.C. Biochemistry 15, 321-327 (1976)
152. McGrath A.E., Morgan C.G., Radda G.K. Biochim. Biophys. Acta 426, 173-185 (1976)
153. Meraldi J.-P., Schlitter J. Biochim. Biophys. Acta 645, 183-210 (1981)
154. Meyer D.M., Lemonnier M., Bourrillon R. Biochem. Biophys. Res. Commun. 103, 1302-1309 (1981)
155. Michaelis L., Menten M.L. Biochem. Z. 49, 333-369 (1913)
156. Michalski J.-C., Corfield A.P., Schauer R. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 362, 222-223 (1981)
157. Michalski J.-C., Corfield A.P., Schauer R. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 363, 1097-1102 (1982)
158. Micheel F., Frier R., Plate E., Hiller A. Chem. Ber. 85, 1092-1096 (1952)
159. Miettinen T., Takki-Luukkainen L.-I. Acta Chem. Scand. 13, 856-858 (1959)
160. Miller C.A., Wang P., Flashner M. Biochem. Biophys. Res. Commun. 83, 1479-1487 (1978)
161. Momoi T., Ando S., Nagai Y. Biochim. Biophys. Acta 441, 488-497 (1976)
162. Morgan I.G., Tettamanti G., Gombos G. Adv. Exp. Med. Biol. 71, 137-150 (1976)
163. Mraz W., Schwarzmann G., Sattler J., Momoi T., Seemann B., Wiegandt H. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 361, 177-185 (1980)
164. Mühleisen M., Probst W., Wiegandt H., Rahmann H. Life Sci. 25, 791-796 (1979)
165. Mullin B.R., Fishman P.H., Lee G., Aloj S.M., Ledley F.D., Winand R.J., Kohn L.D., Brady R.O. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 842-846 (1976)
166. Myers R.W., Lee R.T., Yuan Chuan Lee, Thomas G.H., Reynolds L.W., Uchida Y. Anal. Biochem. 101, 166-174 (1980)

167. Nalecz M.J., Zborowski J., Famulski K.S., Wojtczak L. Eur. J. Biochem. 112, 75-80 (1980)
168. Needham L., Whetton A.D., Houslay M.D. FEBS Lett. 140, 85-88 (1982)
169. Neuenhofer S. "Synthese von Neosialoglykoproteinen als mögliche Immunogene zur Gewinnung monoklonaler Anti-Gangliosid-Antikörper", Diplomarbeit, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn (1982)
170. Nicolson G.L. Int. Rev. Cytol. 39, 89-190 (1974)
171. Öhman R., Rosenberg A., Svennerholm L. Biochemistry 9, 3774-3782 (1970)
172. Ohnishi S., Ito T. Biochemistry 13, 881-887 (1974)
173. Pacuszka I., Duffard R.O., Nishimura R.N., Brady R.O., Fishman P.H. J. Biol. Chem. 253, 5839-5846 (1978)
174. Pallmann B. "Studien über die membrangebundene Neuraminidase", Diplomarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität München (1977)
175. Pallmann B. "Die membrangebundene Neuraminidase - Pathobiochemische und enzymkinetische Untersuchungen", Inaugural-Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München (1980)
176. Papahadjopoulos D., Vail W.J., Pangborn W.A., Poste G. Biochim. Biophys. Acta 448, 265-283 (1976)
177. Parry G., Palmer D.N., Williams D.J. FEBS Lett. 67, 123-129 (1976)
178. Pascher I. Biochim. Biophys. Acta 455, 433-451 (1976)
179. Paterson S.J., Butler K.W., Huang P., Labelle J., Smith I.C.P., Schneider H. Biochim. Biophys. Acta 266, 597-602 (1972)
180. Pellkofer R., Sandhoff K. J. Neurochem. 34, 988-992 (1980)
181. Pellkofer R., Marsh D., Hoffmann-Bleihauer P., Sandhoff K. J. Neurochem. 38, 1230-1235 (1982)
182. Perrin F. J. Phys. Radium 7, 390-401 (1926)
183. Potier M., Mameli L., Bêlisle M., Dallaire L., Melançon S.B. Anal. Biochem. 94, 287-296 (1979)
184. Pottel H., Van der Meer W., Herreman W. Biochim. Biophys. Acta 730, 181-186 (1983)
185. Preti A., Lombardo A., Tettamanti G., Zambotti V. J. Neurochem. 21, 1559-1562 (1973)
186. Preti A., Lombardo A., Cestaro B., Zambotti S., Tettamanti G. Biochim. Biophys. Acta 350, 406-414 (1974)
187. Preti A., Fiorilli A., Lombardo A., Caimi L., Tettamanti G. J. Neurochem. 35, 281-296 (1980)
188. Pringle M.J., Brown K.B., Miller K.W. Mol. Pharmacol. 19, 49-55 (1981)
189. Probst W., Rösner H., Wiegandt H., Rahman H. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 360, 979-986 (1979)
190. Quinn P.J., Chapman D. CRC Critical Reviews in Biochemistry 8, 1-117 (1980)

191. Radsak K., Schwarzmann G., Wiegandt H. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 363, 263-272 (1982)
192. Rafelson M.E., Gold S., Priede I. Methods Enzymol. 8, 677-680 (1966)
193. Rahmann H., Rösner H., Breer H. J. Theor. Biol. 57, 231-237 (1976)
194. Rahmann H., Probst W., Mühleisen M. Jpn. J. Exp. Med. 52, 275-286 (1982)
195. Rauvala H. Eur. J. Biochem. 97, 555-564 (1979)
196. Record M., Loyter A., Gatt S. Biochem. J. 187, 115-121 (1980)
197. Richards C.D. Trends Neurochem. Sci. 3, 9-13 (1980)
198. Roseman S. Chem. Phys. Lipids 5, 270-297 (1970)
199. Rosenberg A., Schengrund C.-L. "Biological Roles of Sialic Acid", Plenum Press New York and London, S. 295-359 (1976)
200. Roth S., Seeman P. Biochim. Biophys. Acta 255, 207-219 (1972)
201. Roukema P.A., Heijlman J. J. Neurochem. 17, 773-780 (1970)
202. Sackmann E. "Light-Induced Charge Separation in Biology and Chemistry", Hrsg. Gerischer H., Katz J.J., Verlag Chemie, Weinheim, S. 259-285 (1979)
203. Saffman P.G., Delbrück M. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 3111-3113 (1975)
204. Saifer A., Gerstenfeld S. Clin. Chim. Acta 7, 467-475 (1962)
205. Saito M., Sugano K., Nagai Y. J. Biol. Chem. 254, 7845-7854 (1979)
206. Sandermann H. Biochim. Biophys. Acta 515, 209-237 (1978)
207. Sandhoff K., Schraven J., Nowoczek G. FEBS Lett. 62, 284-287 (1976)
208. Sandhoff K., Pallmann B. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 122-126 (1978)
209. Sandhoff K., Pallmann B. Adv. Exp. Med. Biol. 101, 463-474 (1978)
210. Sandhoff K., Scheel G., Nehr Korn H. "Sialidases and Sialidoses", Perspectives in Inherited Metabolic Diseases, Vol. 4, Hrsg. Tettamanti G., Durand P., DiDonato S., Edi Ermes, Mailand, S. 125-143 (1981)
211. Sattler J., Schwarzmann G., Staerk J., Ziegler W., Wiegandt H. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 358, 159-163 (1977)
212. Savaki H.E., Levis G.M. Pharmacol. Biochem. Behav. 7, 7-12 (1977)
213. Schauer R., Veh R.W., Sander M., Corfield A.P., Wiegandt H. Adv. Exp. Med. Biol. 125, 283-294 (1980)
214. Scheel G. "Die membrangebundene Neuraminidase als Studienmodell für die Wirkungsweise anästhetischer Agentien", Diplomarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität München (1978)
215. Scheel G., Acevédo E., Conzelmann E., Nehr Korn H., Sandhoff K. Eur. J. Biochem. 127, 245-253 (1982)
216. Schengrund C.-L., Rosenberg A. J. Biol. Chem. 245, 6196-6200 (1970)
217. Schengrund C.-L., Jensen D.S., Rosenberg A. J. Biol. Chem. 247, 2742-2746 (1972)

218. Schengrund C.-L., Nelson J.I. Biochem. Biophys. Res. Commun. 63, 217-223 (1975)
219. Schindler M., Osborn M.J., Koppel D.E. Nature 283, 346-350 (1980)
220. Schlessinger J., Koppel D.E., Axelrod D., Jacobson K., Webb W.W., Elson E.L. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 2409-2413 (1976)
221. Schlessinger J., Barak L.S., Hammes G.G., Yamada K.M., Pastan I., Webb W.W., Elson E.L. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 2909-2913 (1977)
222. Schneider H., Lemasters J.J., Hächli M., Hackenbrock C.R. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 442-446 (1980)
223. Schraven J., Čáp C., Nowoczek G., Sandhoff K. Anal. Biochem. 78, 333-339 (1977)
224. Schroeder F. Eur. J. Biochem. 132, 509-516 (1983)
225. Schubert J. "Synthese von spin- und tritiummarkierten Gangliosid G_{M2} -Analoge", Diplomarbeit, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn (1981)
226. Schwarzmann G. Biochim. Biophys. Acta 529, 106-114 (1978)
227. Schwarzmann G., Hoffmann-Bleihauer P., Schubert J., Sandhoff K., Marsh D. Biochemistry 22, 5041-5048 (1983)
228. Seelig J., Browning J.L. FEBS Lett. 92, 41-44 (1978)
229. Seeman P., Roth S., Schneider H. Biochim. Biophys. Acta 225, 171-184 (1971)
230. Seeman P. Pharmacol. Rev. 24, 583-655 (1972)
231. Seminario L.M., Hren N., Gómez C.J. J. Neurochem. 11, 197-207 (1964)
232. Sharom F.J., Grant C.W.M. J. Supramol. Struct. 6, 249-258 (1977)
233. Sharom F.J., Grant C.W.M. Biochim. Biophys. Acta 507, 280-293 (1978)
234. Sheats J.R., McConnell H.M. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 4661-4663 (1978)
235. Shinitzky M., Dianoux A.-C., Gitler C., Weber G. Biochemistry 10, 2106-2113 (1971)
236. Shinitzky M., Barenholz Y. J. Biol. Chem. 249, 2652-2657 (1974)
237. Shinitzky M., Inbar M. Biochim. Biophys. Acta 433, 133-149 (1976)
238. Shinitzky M., Barenholz Y. Biochim. Biophys. Acta 515, 367-394 (1978)
239. Siegrist H.P., Burkart T., Wiesmann U.N., Herschkowitz N.N., Spycher M.A. J. Neurochem. 33, 497-504 (1979)
240. Sillerud L.O., Schafer D.E., Yu R.K., Königsberg W.H. J. Biol. Chem. 254, 10876-10880 (1979)
241. Singer S.J., Nicolson G.L. Science 175, 720-731 (1972)
242. Singer S.J. Annu. Rev. Biochem. 43, 805-833 (1974)
243. Skrivaneck J.A., Ledeen R.W. J. Neurobiol. 13, 95-106 (1982)

244. Sonnino S., Ghidoni R., Chigorno V.,
Tettamanti G. Adv. Exp. Med. Biol. 152, 55-69 (1982)
245. Spiegel S., Schlessinger J., Fishman P.H. Eingereicht (1983)
246. Suezaki Y., Kaneshina S., Ueda I. J. Colloid Interface Sci. 93, 225-234 (1983)
247. Svennerholm L. Biochim. Biophys. Acta 24, 604-611 (1957)
248. Svennerholm L. J. Neurochem. 10, 613-623 (1963)
249. Svennerholm L. Methods of Carbohydrate Chemistry, Hrsg.
Whistler R.L., Wolfrom M.L., Vol. VI,
Academic Press, New York, S. 464-474 (1970)
250. Svennerholm L. Adv. Exp. Med. Biol. 125, 11-12 (1980)
251. Svennerholm L. ibid. S. 533-544
252. Tettamanti G., Morgan I.G., Gombos G.,
Vicendon G., Mandel P. Brain Res. 47, 515-518 (1972)
253. Tettamanti G., Preti A., Lombardo A.,
Gasparini M., Zambotti V. Biochim. Biophys. Acta 258, 228-237 (1972)
254. Tettamanti G., Venerando B., Preti A.,
Lombardo A., Zambotti V. Adv. Exp. Med. Biol. 25, 161-181 (1972)
255. Tettamanti G., Preti A., Lombardo A.,
Bonali F., Zambotti V. Biochim. Biophys. Acta 306, 466-477 (1973)
256. Tettamanti G., Cestaro B., Lombardo A.,
Preti A., Venerando B., Zambotti V. Biochim. Biophys. Acta 350, 415-424 (1974)
257. Tettamanti G., Preti A., Lombardo A.,
Suman T., Zambotti V. J. Neurochem. 25, 451-456 (1975)
258. Tettamanti G., Venerando B., Cestaro B.,
Preti A. Adv. Exp. Med. Biol. 71, 65-79 (1976)
259. Tettamanti G., Preti A., Cestaro B.,
Venerando B., Lombardo A., Ghidoni R.,
Sonnino S. Adv. Exp. Med. Biol. 125, 263-281 (1980)
260. Tokutomi S., Eguchi G., Ohnishi S.-I. Biochim. Biophys. Acta 552, 78-88 (1979)
261. Trudell J.R. Anesthesiology 46, 5-10 (1977)
262. Tulsiani D.R.P., Carubelli R. J. Biol. Chem. 245, 1821-1827 (1970)
263. Uchida T., Nagai Y., Kawasaki Y.,
Wakayama N. Biochemistry 20, 162-169 (1981)
264. Upreti G.C., Rainier S., Jain M.K. J. Membr. Biol. 55, 97-112 (1980)
265. Van Blitterswijk W.J., Van Hoeven R.P.,
Van der Meer B.W. Biochim. Biophys. Acta 644, 323-332 (1981)
266. Van Deenen L.L.M. FEBS Lett. 123, 3-15 (1981)
267. Van Dijck P.W.M., DeKruifjff B., Verkleij A.J.,
Van Deenen L.L.M., DeGier J. Biochim. Biophys. Acta 512, 84-96 (1978)
268. Van Heyningen S. FEBS Lett. 68, 5-7 (1976)
269. Van Heyningen W.E. Nature 249, 415-417 (1974)

270. Veh R.W., Schauer R. Adv. Exp. Med. Biol. 101, 447-462 (1978)
271. Venerando B., Preti A., Lombardo A., Cestaro B., Tettamanti G. Biochim. Biophys. Acta 527, 17-30 (1978)
272. Venerando B., Cestaro B., Fiorilli A., Ghidoni R., Preti A., Tettamanti G. Biochem. J. 203, 735-742 (1982)
273. Venerando B., Goi G.C., Preti A., Fiorilli A., Lombardo A., Tettamanti G. Neurochem. Int. 4, 313-320 (1982)
274. Vengris V.E., Reynolds F.H., Hollenberg M.D., Pitha P.M. Virology 72, 486-493 (1976)
275. Vengris V.E., Fernie B.F., Pitha P.M. Adv. Exp. Med. Biol. 125, 479-486 (1980)
276. Verger R. Methods Enzymol. 64, 340-392 (1980)
277. Visser A., Emmelot P. J. Membr. Biol. 14, 73-84 (1973)
278. Warner T.G., O'Brien J.S. Biochemistry 18, 2783-2787 (1979)
279. Warren L. J. Biol. Chem. 234, 1971-1975 (1959)
280. Weber G. Adv. Protein Chem. 8, 415-459 (1953)
281. Weber G. J. Chem. Phys. 55, 2399-2407 (1971)
282. Weiss H., Kolb H.J. Eur. J. Biochem. 99, 139-149 (1979)
283. Weiss H., Wingfield P. Eur. J. Biochem. 99, 151-160 (1979)
284. Wiegandt H. J. Neurochem. 14, 671-674 (1967)
285. Wiegandt H. Angew. Chem. 80, 89-132 (1968)
286. Wiegandt H. Adv. Exp. Med. Biol. 125, 3-10 (1980)
287. Wiegandt H., Kanda S., Inoue K., Utsumi K., Nojima S. Adv. Exp. Med. Biol. 152, 343-352 (1982)
288. Woolley D.W., Gommi B.W. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 53, 959-963 (1965)
289. Wu E.-S., Jacobson K., Papahadjopoulos D. Biochemistry 16, 3936-3941 (1977)
290. Yamakawa T., Nagai Y. Trends Biochem. Sci. 3, 128-131 (1978)
291. Yeh A.K., Tulsiani D.R.P., Carubelli R. J. Lab. Clin. Med. 78, 771-778 (1971)
292. Yohe H.C., Rosenberg A. Chem. Phys. Lipids 9, 279-294 (1972)
293. Yohe H.C., Roark D.E., Rosenberg A. J. Biol. Chem. 251, 7083-7087 (1976)
294. Yohe H.C., Rosenberg A. J. Biol. Chem. 252, 2412-2418 (1977)
295. Yohe H.C., Rosenberg A. Neurochem. Res. 3, 101-113 (1978)
296. Yohe H.C., Ueno K., Chang N.-C., Glaser G.H., Yu R.K. J. Neurochem. 34, 560-568 (1980)
297. Yusuf H.K.M., Merat A., Dickerson J.W.T. J. Neurochem. 28, 1299-1304 (1977)
298. Yusuf H.K.M., Dickerson J.W.T. Biochem. J. 174, 655-657 (1978)
299. Zavoico G.B., Kutchai H. Biochim. Biophys. Acta 600, 263-269 (1980)

8. Zusammenfassung

Neuronale Plasmamembranen aus Säugerhirn enthalten eine membrangebundene Sialidase, die aus dort ebenfalls vorkommenden Sialoglykoproteinen und Sialoglykolipiden endständige Sialsäurereste freizusetzen vermag. Solche enzymatischen Reaktionen an und in Membranen folgen besonderen Mechanismen und Gesetzmäßigkeiten, die anhand der Spaltung des sialinsäurehaltigen Glykolipids Gangliosid G_{D1a} durch die Sialidase mikrosomaler Membranen aus Kalbshirncortex näher untersucht wurden.

Um dafür eine Grundlage zu schaffen, mußten brauchbare Bedingungen für den enzymatischen Test erarbeitet und die verwendete Enzympräparation in ihren Eigenschaften charakterisiert werden. Insbesondere interessierte die Stabilität der Sialidase bei verschiedenen Temperaturen, pH-Werten und Ionenstärken, sowie in Gegenwart von Proteasen und Detergentien. Die parallel geführten Messungen mit lipophilen (Gangliosid G_{D1a}) und wasserlöslichen (Sialyllactose, 4-MU-NeuAc) Sialidasesubstraten belegen zusammen mit den Ergebnissen einer partiellen Reinigung der Sialidase, daß die verwendeten mikrosomalen Membranen nur eine einzige Form dieses Enzyms enthalten, die den Umsatz beider Substrattypen katalysiert. Die diesem Konzept teilweise widersprechenden Befunde zum Konkurrenzverhalten beider Substrattypen um das aktive Zentrum der Sialidase und zur unterschiedlichen Hemmbarkeit der enzymatischen Reaktion durch den Sialidaseinhibitor NeuAc-2-en lassen sich möglicherweise auf eine negative Membranaufladung durch Gangliosid G_{D1a} und eine bereits von anderen Autoren postulierte, zusätzliche hydrophobe Bindungsstelle an der Sialidase zurückführen.

Zur Klärung des Ablaufs der Gangliosidspaltung durch die membrangebundene Sialidase wurden ein gereinigtes, tritiummarkiertes Gangliosid G_{D1a} und ein synthetisches, gleichzeitig spin- und tritiummarkiertes Gangliosid- G_{D1a} -Analogon eingesetzt, sowie die Eignung dieser Derivate als Sialidase-substrate mit den von Natur aus in den mikrosomalen Membranen bereits enthaltenen (endogenen) Gangliosidspezies verglichen. Dies führte zu folgenden Beobachtungen:

- 1) Den Testansätzen in mizellarer Form zugesetztes (exogenes) Gangliosid G_{D1a} wird schnell an die mikrosomalen Membranen gebunden. Ein Teil davon läßt sich durch Behandeln mit Protease (Trypsin) wieder von den Membranen ablösen.

- 2) ESR-Messungen deuten darauf hin, daß das mittels Trypsin nicht wieder freisetzbare Gangliosid - zumindest zum größten Teil - in die Lipiddoppelschicht der mikrosomalen Membranen inseriert ist.
- 3) Das enzymatisch gebildete Reaktionsprodukt Gangliosid G_{M1} ist fest an die mikrosomalen Membranen gebunden und erscheint nicht im mittels Trypsin ablösbaren Gangliosidanteil.
- 4) Das trypsinstabil eingebaute Gangliosid G_{D1a} wird - soweit abschätzbar - mit gleicher Geschwindigkeit enzymatisch umgesetzt wie endogenes Gangliosid G_{D1a} .

Diese Ergebnisse veranschaulichen, daß die membrangebundene Sialidase nur solches Gangliosid G_{D1a} als Substrat erkennt und spaltet, das mit ihr in der gleichen Membran vorliegt. Darauf aufbauend läßt sich folgendes Modell zum sialidasekatalysierten Abbau exogenen Gangliosids G_{D1a} entwerfen: Das mizellare Gangliosid adsorbiert an die mikrosomalen Membranen und wird in einem zweiten, langsameren Schritt in die Lipiddoppelschicht inseriert. Anschließend diffundiert es in der Membranebene (laterale Diffusion) zur Sialidase und dient nun erst als Substrat. Dieses auf den ersten Blick recht einfache Modell zieht eine Reihe von Konsequenzen nach sich, die experimentell bestätigt werden konnten:

- 1) Die Umsatzgeschwindigkeit ist nicht unabhängig von der Geschwindigkeit des Gangliosideinbaus.
- 2) Der Reaktionsraum für die enzymatische Spaltung wird ausschließlich von der Membran gestellt; eine Verdünnung des wässrigen Ansatzvolumens verändert die Umsatzgeschwindigkeit nicht.
- 3) Eingesetzte Enzymmenge und effektives Reaktionsvolumen sind untrennbar miteinander verknüpft. Dies verursacht bei konstantgehaltener Gangliosidmenge eine hyperbole Abhängigkeit der Umsatzrate von der eingesetzten Menge an membrangebundener Sialidase und eine Proportionalität zwischen der Membranmenge und der ermittelten, scheinbaren Michaelis-Konstante für die Gangliosidspaltung.
- 4) Die Viskosität von Membranen beträgt ein Vielfaches derjenigen von Wasser; sie läßt sich aber durch lipidlösliche, niedermolekulare Substanzen, wie z.B. allgemeine Anästhetika, deutlich absenken. Dies könnte die laterale Diffusion des Gangliosids in der Membranebene erleichtern und so das Substratangebot für die Sialidase erhöhen. In Übereinstimmung damit stieg die Umsatzgeschwindigkeit in Gegenwart der Alkohole n-Pentanol,

n-Hexanol, n-Heptanol und n-Octanol konzentrationsabhängig an. Das Ausmaß der Zunahme korrelierte quantitativ mit der anhand der Fluoreszenzdepolarisation von DPH gemessenen Membranfluidität und war unabhängig davon, welcher der genannten Alkohole die Fluidisierung verursachte.

- 5) Ein erhöhtes Substratangebot infolge einer erleichterten Lateraldiffusion erniedrigt die scheinbare Michaelis-Konstante K_M . In Gegenwart steigender Konzentrationen an n-Hexanol ergab sich eine proportionale Zunahme von $\frac{1}{K_M}$ mit der Membranfluidität.

Alle diese Befunde konnten nur mit Gangliosid G_{D1a} als Substrat erhoben werden, nicht aber mit wasserlöslichen Substraten, deren Abbau den normalen Gesetzmäßigkeiten der Enzymkinetik in wässrigen Lösungen gehorchte.

Im Zuge der Untersuchungen wurden aber auch Beobachtungen gemacht, die über das vorgestellte Modell hinausweisen. So führte ein Einfrieren und Wieder-Auftauen der mikrosomalen Membranen ebenso wie eine Erniedrigung der Salzkonzentration im Inkubationsansatz oder eine Erhöhung der Membranfluidität durch Zugabe von n-Hexanol zu einem Anstieg der Maximalgeschwindigkeit des Gangliosidumsatzes, während sich die Umsatzgeschwindigkeit für wasserlösliche Substrate dadurch nicht oder nur geringfügig änderte. Eine solche Aktivierung latent vorhandener Sialidase läßt sich unter der heute bereits gut gestützten Annahme deuten, daß biologische Membranen nicht einfach aus einer durchgehend flüssig-kristallinen Lipiddoppelschicht mit eingelagerten Proteinen bestehen und sich in ihren hydrodynamischen Eigenschaften lediglich durch die eine Größe "Membranviskosität" hinreichend beschreiben lassen, sondern daß sie in Unterstrukturen, wie z.B. Lipid-cluster im Gelzustand oder funktionelle Lipid/Protein-Domänen, gegliedert sind, die die Geschwindigkeit der Lateraldiffusion und den Anteil der daran teilnehmenden Membranbestandteile mitbestimmen.

Abschließend wird die physiologische Bedeutung der dargelegten Ergebnisse und Modellvorstellungen für den Stoffwechsel in Membranen im allgemeinen und für den Stoffwechsel von Sialoglykolipiden im besonderen eingehend diskutiert, sowie auf mögliche Folgerungen für die heute gängigen Modelle zum Mechanismus der Anästhesie hingewiesen.

L E B E N S L A U F

Ich, Günther Scheel, wurde am 26. April 1953 als drittes Kind der Eheleute Adam Scheel und Franziska, geb. Steinmaßl, in Bad Reichenhall geboren. Dort besuchte ich von 1959 bis 1965 die Volksschule und anschließend von 1965 bis 1969 die Realschule in Freilassing. 1969 wechselte ich auf das Karlsgymnasium in Bad Reichenhall, wo ich 1972 das Abitur ablegte.

Im Wintersemester 1972/73 immatrikulierte ich mich zum Studium der Chemie an der Ludwig-Maximilians-Universität München und bestand dort im Juli 1977 die mündliche Diplomprüfung. Die Diplomarbeit mit dem Titel "Die membrangebundene Neuraminidase als Studienmodell für die Wirkungsweise anästhetischer Agentien" fertigte ich von September 1977 bis Juli 1978 in der neurochemischen Abteilung des Max-Planck-Instituts für Psychiatrie in München an. In Weiterführung dieses Themas begann ich dort mit den experimentellen Arbeiten zur vorliegenden Dissertation, die ich nach Berufung des Doktorvaters, Herrn Prof. Dr. K. Sandhoff, an die Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität in Bonn am dortigen Institut für Organische Chemie und Biochemie fortsetzte und im Frühjahr 1982 abschloß. Von August 1982 bis November 1983 leistete ich an der Universitätskinderklinik in München meinen Zivildienst ab.

